

UNIVERSITE DE GENEVE

FACULTE DES SCIENCES

Département de biologie végétale

Microbiologie

Prof. G. TURIAN

Institut de microbiologie (Faculté de Médecine)

Prof. R. H. REGAMEY

ETUDE DE LA RESISTANCE A LA STREPTOMYCINE
CHEZ LES SOUCHES SAUVAGES D'ENTEROBACTERIES

THESE

présentée à la Faculté des sciences de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur ès sciences biologiques

par

Mahshid RASSEKH

de Kazvine, Iran

Thèse No 1630

GENEVE

Imprimerie de la Section
de Physique

1 9 7 4

UNIVERSITE DE GENEVE

FACULTE DES SCIENCES

Département de biologie végétale

Microbiologie

Prof. G. TURIAN

Institut de microbiologie (Faculté de Médecine)

Prof. R. H. REGAMEY

ETUDE DE LA RESISTANCE A LA STREPTOMYCINE
CHEZ LES SOUCHES SAUVAGES D'ENTEROBACTERIES

THESE

présentée à la Faculté des sciences de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur ès sciences biologiques

par

Mahshid RASSEKH

de Kazvine, Iran

Thèse No 1630

GENEVE

Imprimerie de la Section
de Physique

1 9 7 4

La faculté des sciences, sur le préavis du professeur R. H. REGAMEY, directeur scientifique, et d'une commission composée du professeur G. TURIAN, responsable devant la faculté des sciences, et du docteur J. S. PITTON autorise l'impression de la présente thèse, sans exprimer d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

GENEVE, le 26 septembre 1973

Thèse ---1630---

Le Doyen :

Jean MULLER



Je remercie les Professeurs R. H. Regamey et G. Turian pour le soutien qu'ils ont apporté dans ce travail.

J'adresse mes remerciements au PD Docteur J. S. Pitton pour l'aide et les conseils fructueux qu'il a bien voulu m'accorder.

J'exprime ma très profonde gratitude au PD Docteur C. Ahmad-Zadeh pour l'aide et les conseils précieux qu'il m'a constamment prodigués tout au long de ce travail.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545931_0044

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION

A MES PARENTS

1.1. Introduction

1.1.1. Objectifs de l'étude

1.1.2. Importance de l'étude pour les parents

1.1.3. Méthode de recherche utilisée

1.1.4. Résultats

1.1.5. Conclusion de l'étude

1.1.6. Implications pratiques

1.1.7. Limites de l'étude

1.1.8. Perspectives de recherche

1.1.9. Remerciements

1.1.10. Bibliographie

1.2. Conclusion

1.2.1. Résumé

1.2.2. Synthèse

1.2.3. Perspectives

1.2.4.1. Synthèse

1.2.4.2. Synthèse

1.2.4.3. Synthèse

1.2.4.4. Synthèse

1.2.5. Synthèse de la recherche

1.2.6. Synthèse de la recherche

1.2.7. Synthèse de la recherche

1.3. Conclusion

CHAPITRE 2 : CARACTÉRISATION DE L'ENVIRONNEMENT DE L'ÉDUCATION DE LA FAMILLE EN FRAISSE (CITÉ DE LA GUYANE FRANÇAISE) EN 2015 ET EN 2016 (ÉTUDE DE LA SÉRIE TEMPORELLE)

2.1. Introduction

2.2. Méthode

2.2.1. Contexte de l'étude

2.2.2. Caractéristiques de l'échantillon

2.2.3. Méthode de collecte des données

2.2.4. Méthode de traitement des données

2.2.5. Résultats

2.2.5.1. Synthèse des résultats

2.2.5.2. Synthèse

2.2.5.3. Synthèse

2.2.5.4. Synthèse

2.2.6. Synthèse

2.2.7. Synthèse

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	1
Chapitre 1 INCIDENCE DES DIFFERENTS TYPES DE RESISTANCE A LA STREPTOMYCINE CHEZ LES SOUCHES SAUVAGES D'ENTEROBACTERIES	4
1.1 Matériel et méthodes	4
1.1.1 Souches bactériennes	4
1.1.2 Spectre de résistance aux différents antibiotiques	4
1.1.3 Niveau de résistance à la streptomycine	5
1.1.4 Transférabilité	6
1.1.5 Inactivation enzymatique de la streptomycine	7
1.1.5.1 Système cellulaire	7
1.1.5.2 " acellulaire	8
a) choc osmotique	8
b) trituration à l'alumine	9
1.1.6 Induction par irradiation aux rayons ultraviolets RUV	10
1.2. Résultats	10
1.2.1 Niveau de résistance	10
1.2.2 Transférabilité	10
1.2.3 Inactivation enzymatique	10
1.2.3.1 Système cellulaire	10
1.2.3.2 " acellulaire	12
a) choc osmotique	12
b) trituration à l'alumine	12
1.2.4 Cinétique de la réaction d'inactivation	12
1.2.5 Spécificité du substrat	13
1.2.6 Induction de la synthèse de l'enzyme	14
1.3 Discussion et conclusions	14
Chapitre 2 CARACTERISATION DE L'ENZYME RESPONSABLE DE L'INACTIVATION DE LA STREPTOMYCINE CHEZ CERTAINES SOUCHES SAUVAGES DE <u>E. COLI</u> ET DE SALMONELLES PORTANT UN DETERMINANT PLASMIDIQUE	17
2.1 Introduction	17
2.2 Matériel et méthodes	18
2.2.1 Extraction des protéines	18
2.2.2 Chromatographie sur diéthyl-amino-éthyl-cellulose	18
2.2.3 Filtration sur gel de Séphadex	19
2.2.4 Electrophorèse sur gel de polyacrylamide	19
2.2.5 Techniques immunologiques	19
2.2.5.1 Préparation des antisérums	20
2.2.5.2 Immunodiffusion	20
a) Méthode d'Ouchterlony	20
b) Immunoélectrophorèse	21
2.2.6 Isoélectrofocalisation	22
2.2.7 Force ionique	22

II

2.3	Résultats	22
2.3.1	Elution de l'enzyme sur DEAE-cellulose	22
2.3.2	Poids moléculaire	23
2.3.3	Point isoélectrique	24
2.3.4	Antigénicité	24
2.4	Discussion et conclusions	25
Chapitre 3 DISTRIBUTION GENETIQUE DE LA RESISTANCE A LA STREPTOMYCINE EN FONCTION DU LOCUS A OU DU LOCUS B CHEZ LES SOUCHES SAUVAGES DE SALMONELLES PORTANT UNE MUTATION CHROMOSOMIQUE		27
3.1	Introduction	27
3.2	Matériel et méthodes	28
3.2.1	Souches bactériennes	28
3.2.2	Préparation des ribosomes	29
	a) Concentration de S100	29
	b) Purification des ribosomes	29
3.2.3	Préparation de l'ARN du phage R17	30
3.2.4	Synthèse de chaînes polypeptidiques 'in vitro'	31
	a) Synthèse dirigée par le messenger poly U	31
	b) " " " l'ARN du phage R17	32
3.3	Résultats	33
3.4	Discussion et conclusions	34
Chapitre 4 LIAISON DE LA DIHYDROSTREPTOMYCINE TRITIEE (DHSM-H ³) AUX SOUS-UNITES RIBOSOMIQUES ET INCORPORATION CELLULAIRE DE DHSM-H ³		36
4.1	Introduction	36
4.2	Matériel et méthodes	37
4.2.1	Souches bactériennes	37
4.2.2	Préparation des ribosomes	38
4.2.3	Séparation des sous-unités ribosomiques	38
4.2.4	Tests de liaison de la DHSM-H ³ sur les sous-unités ribosomiques	38
4.2.5	Tests d'incorporation cellulaire de la DHSM-H ³	39
4.3	Résultats	39
4.3.1	Liaison de la DHSM-H ³ sur les sous-unités ribosomiques	39
4.3.2	Incorporation cellulaire de la DHSM-H ³	42
4.4	Discussion et conclusions	43
DISCUSSION FINALE ET CONCLUSIONS		45
RESUME		49
BIBLIOGRAPHIE		50

INTRODUCTION

La résistance des entérobactéries à la streptomycine a fait l'objet de nombreux travaux; ceux-ci concernaient essentiellement certains mutants obtenus en laboratoire. L'étude de souches sauvages d'entérobactéries représente un des aspects originaux du présent travail. Les publications antérieures sur la streptomycine ont apporté des données fondamentales sur la résistance à contrôle chromosomique. Par contre, plusieurs aspects de la résistance due à un élément extrachromosomique n'ont pas été résolus; ce dernier point a spécialement retenu notre attention.

Il importe de distinguer d'emblée les deux formes de résistance.

La résistance peut être acquise par mutation, en absence de l'antibiotique, fait démontré par les techniques classiques de LURIA et DELBRÜCK (1943), DEMEREC (1948) et LEDERBERG et LEDERBERG (1952). L'antibiotique agit ici comme agent de sélection, mettant en évidence les changements génotypiques intervenus dans la cellule bactérienne.

La résistance dite infectieuse est transmise 'in vitro' et 'in vivo' par des facteurs extrachromosomiques (WATANABE, 1963; ANDERSON, 1968).

Pendant longtemps, le seul mécanisme envisagé était celui de la résistance à contrôle chromosomique. Pour la première fois KITAMOTO et coll. (1956) font remarquer l'apparition d'une multirésistance à différents antibiotiques chez certaines souches de shigelles. AKIBA et coll. (1959) postulèrent alors l'existence d'un nouveau mécanisme chez les souches portant des résistances multiples, suggérant que celles-ci pouvaient être transférées 'en bloc'. Plus tard WATANABE et FUSAKAWA (1961) montrent que ce type de transmission de résistance est dû à des phénomènes de conjugaison entre un donneur multirésistant et une cellule réceptrice sensible.

L'hypothèse fut avancée d'une origine chromosomique pour les gènes contrôlant ces nouvelles formes de résistance : l'apparition de la multirésistance par le 'pick up' de gènes chromosomiques serait imputable à un facteur de transfert (LEBEK 1963; GINOZA et PAINTER 1964; STANLEY et coll. 1966). Cette hypothèse paraît actuellement peu vraisemblable. En effet, on observe fréquemment chez les entérobactériacées l'apparition simultanée de résistance à plusieurs antibiotiques différents. La fréquence d'une mutation bactérienne étant de l'ordre de 10^{-6} à 10^{-10} , l'obtention simultanée de quatre mutations doit être un phénomène extrêmement rare et incapable d'expliquer la distribution relativement fréquente d'une multirésistance aux antibiotiques. De plus, il faudrait interpréter le 'pick up' séquentiel de ces quatre gènes chromosomiques, après mutation, par un facteur de transfert, ce qui exigerait la réalisation d'un événement par trop exceptionnel pour expliquer un phénomène couramment observé. Un dernier argument contre l'hypothèse de l'origine chromosomique des déterminants plasmidiques réside dans le mécanisme d'action qu'ils contrôlent. En général, la résistance plasmidique relève d'une inactivation enzymatique : adénylation, phosphorylation, acétylation, action d'une β -lactamase. A l'exception de l'impact de la pénicillinase, la résistance chromosomique est impu-

table à un mécanisme sans rapport avec une inactivation enzymatique.

La streptomycine fut choisie dans notre étude parce que nous connaissons bien la résistance chromosomique à cet antibiotique chez les souches de laboratoire. Il est généralement admis qu'il existe deux modes pour le contrôle de la résistance à la streptomycine :

- une résistance à contrôle chromosomique et
- une résistance à contrôle extrachromosomique.

La résistance à contrôle chromosomique chez les souches de laboratoire a été étudiée par FLAKS et coll. (1962), SPEYER et coll. (1962), TRAUB et NOMURA (1968 a et b), NOMURA (1970) et TRAUB (1970). Les résultats obtenus par l'étude de la synthèse de polypeptides 'in vitro' suggèrent qu'il n'y a qu'un seul site ribosomique sur lequel puisse se fixer la streptomycine : en induisant des troubles dans la synthèse des protéines, l'antibiotique provoque la mort de la bactérie. Toute mutation supprimant ce site de fixation ou le modifiant de façon à inhiber l'activité de l'antibiotique constitue une mutation vers la résistance. Il est important de noter que le caractère de la résistance chromosomique est récessif (LEDERBERG, 1951).

On doit à ROSENKRANZ (1964) une des premières observations sur les différences dans le mode de résistance à la streptomycine selon que le contrôle est chromosomique ou extrachromosomique. Cet auteur a montré que les ribosomes qui proviennent d'une souche de E. coli portant une résistance transférable -et comportant une résistance à la streptomycine- ont un comportement identique à celui des ribosomes de souches sensibles. En effet, la synthèse de chaînes polypeptidiques en présence de ces ribosomes est fortement inhibée par la streptomycine. Ces résultats suggèrent l'existence d'un autre mode de résistance à la streptomycine, localisée en dehors des ribosomes; Rosenkranz émit l'hypothèse d'une modification de la perméabilité cellulaire.

Peu après, OKAMOTO et SUZUKI (1965) mirent en évidence l'inactivation enzymatique de la dihydrostreptomycine, de la kanamycine et du chloramphénicol chez une souche de E. coli K12 portant un facteur R; ils ne retrouvèrent pas la même inactivation avec des extraits obtenus à partir des bactéries sensibles. Mais leurs expériences ne permettaient pas de préciser le mode d'inactivation de la dihydrostreptomycine. Par la suite, UMEZAWA et coll. (1967) ont postulé un mécanisme de phosphorylation responsable de l'inactivation enzymatique des aminoglycosides; UMEZAWA et coll. (1968) décrivent un autre mode d'inactivation de la streptomycine par adénylation dans un système ATP-dépendant.

YAMADA et coll. (1968) ont publié les premières analyses détaillées concernant l'inactivation de la streptomycine par des systèmes enzymatiques contrôlés par des gènes extrachromosomiques; ils ont obtenu l'enzyme inactivatrice en utilisant la technique du choc osmotique (NOSSAL et HEPPEL, 1966) à partir d'une souche sauvage de E. coli porteuse d'un déterminant plasmidique. Par l'emploi de ATP- α P³², ces auteurs ont montré que l'inactivation de la streptomycine était due à une adénylation. HARWOOD et SMITH (1969) ont confirmé l'existence de cette enzyme et ont montré, de plus, le caractère dominant de la résistance extrachromosomique.

Par des études sur deux types de souches, l'une streptomycino-résistante et spectinomycino-sensible, l'autre streptomycino-résistante et spectinomy-

cino-résistante, OZANNE et coll. (1969) ont mis en évidence qu'il existait en effet deux types de souches selon la variété de ces deux enzymes :

- les souches portant une résistance extrachromosomique à la fois à la streptomycine et à la spectinomycine contiennent une enzyme adénylante;
- les souches portant une résistance extrachromosomique uniquement à la streptomycine possèdent une enzyme de type phosphorylant. Ces deux enzymes, réagissant sur le même radical de la molécule de streptomycine, sont périplasmiques et ATP- dépendantes.

BENVENISTE et coll. (1970) ont repris l'étude de l'adénylsynthétase sans pouvoir cependant la caractériser définitivement.

Le mode de résistance à la streptomycine étant, -nous l'avons vu-, connu pour les mutants de certaines souches de laboratoire, nous avons cherché à déterminer quelle était l'incidence de différents types de résistance à cet antibiotique chez quelques souches sauvages de E. coli et de salmonelles. Nous avons en outre précisé certains caractères de l'enzyme responsable de l'inactivation de la streptomycine chez des souches sauvages de E. coli et de salmonelles porteuses d'une résistance plasmidique. Finalement, nous avons étudié les différents modes de résistance chromosomique qui existent chez les souches sauvages de salmonelles.

L'étude que nous présentons comporte quatre chapitres consacrés aux thèmes suivants :

- Chapitre 1. Incidence des différents types de résistance à la streptomycine chez les souches sauvages d'entérobactéries.
- Chapitre 2. Caractérisation de l'enzyme responsable de l'inactivation de la streptomycine chez certaines souches sauvages de E. coli et de salmonelles portant un déterminant plasmidique.
- Chapitre 3. Distribution génétique de la résistance à la streptomycine en fonction du locus A ou du locus B chez les souches sauvages de salmonelles portant une mutation chromosomique.
- Chapitre 4. Liaison de la dihydrostreptomycine- H^3 sur les sous-unités ribosomiques et incorporation cellulaire de la dihydrostreptomycine- H^3 .

Dans la règle, chaque chapitre comprend une introduction, une partie détaillée réservée au matériel et méthodes (sauf pour les chapitres 1 et 2, où nous avons fait usage de techniques classiques), l'exposé des résultats suivi d'une discussion et de conclusions.

Chapitre 1

INCIDENCE DES DIFFERENTS TYPES DE RESISTANCE A LA STREPTOMYCINE CHEZ LES SOUCHES SAUVAGES D'ENTEROBACTERIES

- 1.1 Matériel et méthodes
 - 1.1.1 Souches bactériennes
 - 1.1.2 Spectre de résistance aux différents antibiotiques
 - 1.1.3 Niveau de résistance à la streptomycine
 - 1.1.4 Transférabilité
 - 1.1.5 Inactivation enzymatique de la streptomycine
 - 1.1.5.1 Système cellulaire
 - 1.1.5.2 " acellulaire
 - a) choc osmotique
 - b) trituration à l'alumine
 - 1.1.6 Induction par irradiations aux rayons ultraviolets
- 1.2 Résultats
 - 1.2.1 Niveau de résistance
 - 1.2.2 Transférabilité
 - 1.2.3 Inactivation enzymatique
 - 1.2.3.1 Système cellulaire
 - 1.2.3.2 " acellulaire
 - a) choc osmotique
 - b) trituration à l'alumine
 - 1.2.4 Cinétique de la réaction d'inactivation
 - 1.2.5 Spécificité du substrat
 - 1.2.6 Induction de la synthèse de l'enzyme
- 1.3 Discussion et conclusions

1.1. MATERIEL ET METHODES

1.1.1 Souches bactériennes

Nous avons choisi 54 souches sauvages de E. coli et 20 souches sauvages de salmonelles provenant de spécimens cliniques.

1.1.2 Spectre de résistance aux différents antibiotiques

Ce spectre fut déterminé par la méthode des bandes imprégnées de différents antibiotiques : ampicilline, streptomycine, tétracycline, chloramphénicol et acide nalidixique. Des cultures de 3 heures en bouillon sont étalées sur une gélose nutritive; la bande est ensuite placée à la surface de la gélose. Après 16 heures d'incubation à 37°C, on compare sur chaque boîte la croissance des souches à tester à celle des deux souches témoins, une sensible et une résistante.

1.1.3 Niveau de résistance à la streptomycine

Cette détermination est faite en milieu liquide (Antibiotic Medium No.3; Bacto Penassay Broth, Difco). Les souches sont mises en présence de concentrations croissantes de streptomycine (0-300 µg/ml). Elles sont incubées 16-18 heures à 37°C. La concentration minima inhibitrice (CMI) est définie comme étant la concentration la plus faible pour laquelle on ne peut détecter de croissance visible, après incubation de 16-18 heures à 37°C.

Dans ces expériences, nous avons utilisé différents pH (7; 7,5; 8) et dif-

Tableau I

Concentration minima inhibitrice de streptomycine pour E. coli

Souche	Spectre de résistance	Inoculum 10 ⁴ 10 ⁶ CMI : µg/ml		Souche	Spectre de résistance	Inoculum 10 ⁴ 10 ⁶ CMI : µg/ml					
R 201	S	100	100	R 208	SCT	100	250				
R 435		50	50	R 236		25	50				
R 481		100	250	R 307		12,5	25				
R 451		6	12,5	R 279		12,5	25				
R 206		25	50	R 264		50	100				
R 271		ST	25	50	R 21	SAT	100	250			
R 87			25	25	R 567		6	25			
R 126			25	50	R 568		12,5	25			
R 127			12,5	100	R 569		6	12,5			
R 136			25	50	R 254c		SACT	25	50		
R 176	12,5		50	R 254d	100	250					
R 252	100		250	R 70a	50	50					
R 261	100		100	R 70b	50	50					
R 48	6		12,5	R 328	25	50					
R 190	SC		100	100	R 314		6	12,5			
R 109		12,5	50	R 225	50		250				
R 108		12,5	50	R 144	25		50				
R 203		50	50	R 232	100		250				
R 321		25	50	R 566	12,5		12,5				
R 344		SA	25	50	* K12(4R256)		100	100			
R 570			25	50	R 241		SACNx	50	50		
* K12(RT1)			SAT	50	100		R 146	SCTNx	12,5	25	
R 565				SAC	12,5		12,5	R 224		250	250
R 571					6		25	R 385	SACTNx	25	50
R 310	SNx			25	50	R 411		100	100		
R 32	SCT			100	100	R 179		25	50		
R 181			25	25	R 331		50	100			

Légende

K12 (RT1) = E. coli K12 portant un déterminant plasmidique isolé d'une souche de S. typhimurium.

K12 (4R256) = E. coli K12 portant un déterminant plasmidique isolé d'une souche de S. typhimurium.

10⁴ et 10⁶ = inoculum : nombre de germes par ml.

S = streptomycine

A = ampicilline

T = tétracycline

C = chloramphénicol

Nx = acide nalidixique

férentes quantités d'inoculum, soit 10^4 et 10^6 germes/ml. Les résultats de la détermination du niveau de résistance en fonction de l'inoculum ainsi que les spectres de résistance sont rapportés dans les Tableaux I et II.

1.1.4 Transférabilité

Les tests de transférabilité ont été effectués selon ANDERSON et LEWIS (1965) et ANDERSON (1965).

A. Pour les E. coli sauvages, les souches réceptrices sont :

- 1) S. typhi, lysotype A (S. typhi)
- 2) S. paratyphi B, lysotype 1 var. 2 (S. para B)
- 3) S. typhimurium, lysotype 36 (S. typhimurium)
- 4) E. coli K12 F⁻ lac⁻ Nx^r.

Comme milieu de sélection, nous avons utilisé un agar pour salmonelles-shigelles (S.S. Agar (BBL)) contenant 200 µg/ml de sulfate de streptomycine.

La technique suivante a été appliquée. Les cultures de bactéries donatrices et réceptrices sont repiquées en bouillon. Elles sont incubées pendant 6 heures à 37°C avec agitation. Nous ajoutons 1 ml de donatrices

Tableau II

Concentration minima inhibitrice de la streptomycine pour salmonelles sauvages

Souche	Espèce	Spectre de résistance	Inoculum	
			10 ⁴	10 ⁶
			CMI : µg/ml	
RS 131	<u>S. typhimurium</u>	SA	100	100
RS 133	"	SA	250	250
RS 27	"	ST	50	100
RS 204	"	SACTN _x	12,5	50
* RT1	"	SATS _u	100	100
* 4R 256	"	SCTS _u	100	100
* 7R 334	<u>S. paratyphi B</u>	SACS _u	50	50
RS 173	<u>S. brandenburg</u>	ST	25	100
RS 177	"	ST	50	250
RS 81	"	SAT	100	100
RS 114	"	SAT	100	100
RS 168/3	<u>S. heidelberg</u>	SACT	250	250
RS 168/5	"	SA	100	250
RS 168/7	"	SAC	100	100
RS 191	<u>S. panama</u>	SACTN _x	6	50
RS 192	"	SACTN _x	6	25
RS 59	<u>S. dublin</u>	ST	6	12,5
RS 161	<u>S. enteritidis</u>	SACTN _x	25	50
RS 211	<u>S. saint Paul</u>	SACTN _x	25	50
RS 206	<u>S. oranienburg</u>	SACTN _x	50	100

* Ces souches nous ont été fournies par le Dr E.S. Anderson, Enteric Reference Laboratory Central Public Health, London.

à 1 ml de réceptrices. Le mélange est incubé 16-18 heures sans agitation à 37°C. Un volume de 0,01 ml de ce dernier est étalé sur le milieu de sélection.

Lorsque la souche réceptrice est E. coli K12 F⁻ lac⁻ Nx^r, nous avons pris comme milieu de sélection un Mac Conkey Agar (Bacto Mac Conkey Agar, Difco) contenant 200 µg/ml de streptomycine et 40 µg/ml d'acide nalidixique (utilisé comme agent de contre-sélection pour la souche donatrice).

B. Pour les salmonelles, les souches réceptrices sont :

- 1) E. coli K12-703, type sauvage F⁻
- 2) E. coli K12-58-161 (met⁻ azi^s str^s T1^s T6^s F⁺).

Dans ce cas le milieu de sélection est un Mac Conkey Agar, qui renferme 200 µg/ml de streptomycine et, par plaque, 0,3 ml d'une suspension de phage 01 (utilisé comme agent de contre-sélection pour la souche donatrice).

1.1.5 Inactivation enzymatique de la streptomycine

Nous avons recouru ici à deux systèmes différents : un système cellulaire et un système acellulaire.

1.1.5.1 Système cellulaire

Les bactéries sont cultivées en présence de streptomycine (sous forme de sulfate) dans du bouillon à pH 8. La concentration finale de l'antibiotique est de 100 µg/ml. Nous avons incubé ces cultures pendant 18 heures à 37°C avec agitation. Les surnageants obtenus à partir de ces cultures, après une centrifugation de 10 min à 7000 g, ont été placés à une température de 60°C pendant 10 min pour supprimer les germes existants. Après une nouvelle centrifugation de 10 min à 9000 g, le surnageant est utilisé pour déterminer l'activité résiduelle de l'antibiotique. Le dosage est exécuté par une méthode microbiologique (PIGUET et PITTON, 1968), avec B. subtilis comme souche indicatrice.

On coule une première couche de 15 ml de gélose (Antibiotic Medium No. 1; Bacto Penassay Seed Agar, Difco, pH 8) dans 5 boîtes de pétri de 14 cm de diamètre. Après solidification, on coule la deuxième couche soit 10 ml de gélose contenant 10 % d'une suspension de spores de B. subtilis; la suspension est diluée 1:250 avec le soluté physiologique de chlorure de sodium (sol. phys.). Au moyen d'un emporte-pièce, on prépare des cupules de 8 mm de diamètre. On les remplit avec 0,05 ml de chaque échantillon. Les plaques sont incubées pendant 16-18 heures à 37°C. Les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés avec une précision de $\pm 0,1$ mm. L'activité résiduelle de l'antibiotique est calculée sur une droite de régression établie au moyen des valeurs trouvées avec une substance étalon.

Nous avons effectué les tests d'inactivation dans les milieux suivants :

- 1) Bouillon nutritif : Bacto Nutrient Broth, Difco.
- 2) Bouillon synthétique : (par litre) Na₂HPO₄, 35 g; KH₂PO₄, 15 g; NaCl, 2,5 g; MgCl₂ . 6H₂O, 1 g; glucose, 40 g; acides aminés (Bacto Vitamine Free, Casamino Acids, Difco), 50 ml d'une solution à 20 %.

- 3) Bouillon de stock : (par litre) Bacto Nutrient Broth, Difco, 8 g; extrait de levure (Bacto Yeast Extract, Difco), 0,6 g; Na_2HPO_4 , 2,9 g; KH_2PO_4 , 1,3 g; NH_4Cl , 0,28 g; H_2O , 900 ml; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 9,9 %, 1 ml et 50 ml d'une solution de 0,6 g/ml de glucose.

Le deuxième paramètre modifié fut le pH. Nous avons utilisé des pH de : 5; 5,5; 6; 6,5; 7; 7,5 et 8.

Nous avons également changé les conditions de croissance des cellules bactériennes en introduisant la streptomycine dans les différentes phases de croissance : phase de latence, phase logarithmique et phase stationnaire.

Nous avons aussi varié le temps d'incubation des cellules en présence de streptomycine : 2 heures, 4 heures et finalement 18 heures.

Le dernier facteur qui nous sembla devoir jouer un rôle dans l'inactivation était la concentration en streptomycine dans le milieu de culture. Les concentrations que nous avons choisies ont été de 100, 50, 25 et 12,5 $\mu\text{g/ml}$.

Pour chacune de ces variantes, nous avons utilisé deux différentes quantités d'inoculum soit 10^4 et 10^6 germes/ml.

1.1.5.2 Système acellulaire

Les diverses modifications apportées à nos conditions expérimentales n'ayant pas abouti à des résultats concluants, nous avons effectué les tests d'inactivation dans un système acellulaire. C'est ainsi que nous avons obtenu l'enzyme responsable de l'inactivation de la streptomycine par deux méthodes différentes : a) par choc osmotique, b) par trituration à l'alumine des cellules congelées.

a) Choc osmotique

Plusieurs enzymes périplasmiques peuvent être obtenues à partir de cellules en phase exponentielle par un choc osmotique (NOSSAL et HEPPEL, 1966). On a suggéré que l'enzyme responsable de l'inactivation de la streptomycine pourrait être une enzyme périplasmique (YAMADA et coll., 1968). Il nous a donc semblé possible d'obtenir l'enzyme par cette méthode.

Le point essentiel dans le choc osmotique est le passage des cellules d'un milieu hypertonique en milieu hypotonique. Un tel passage augmente la perméabilité de la membrane et libère les enzymes localisées dans l'espace périplasmique.

Les souches bactériennes sensibles ou résistantes sont cultivées en milieu synthétique. Lorsque la croissance bactérienne atteint la phase logarithmique, on arrête la croissance par transfert dans un bain de glace. La culture est soumise à une centrifugation de 20 min à 30.000 g. Le culot recueilli est alors lavé à deux reprises en Tris- NaCl (Tris- HCl , 0,01 M; NaCl , 0,03 M; pH 7,1), ce qui permet d'éliminer les sucres et les autres substances qui pourraient entraver le fonctionnement de l'enzyme.

Un gramme de culot est mis en présence de 80 volumes d'une solution hypertonique (Tris- HCl , 0,033 M; saccharose, 20 %; EDTA, 10^{-4}M ; pH 7,8) pendant 10 min à température ordinaire. Le mélange est assuré par un mouvement rotatoire continu dû à un agitateur magnétique. Après centrifugation 8 min à 13.000 g, les culots sont immédiatement dispersés dans 20 volumes

d'eau glacée; on agite le mélange pendant 5 - 25 min à température de 4°C. Une dernière centrifugation de 15 min à 13.000 g à 4°C permettra d'obtenir le surnageant contenant les enzymes périplasmiques, y compris l'enzyme responsable de l'inactivation de la streptomycine.

b) Trituration à l'alumine

La méthode utilisée pour obtenir la totalité des protéines cellulaires, y compris l'enzyme responsable de l'inactivation de la streptomycine fut celle de TISSIERES et coll. (1959).

Les bactéries résistantes ou sensibles à la streptomycine sont obtenues par la méthode décrite ci-dessus. Les culots des cellules, lavés deux fois en Tris-NaCl, puis congelés, sont broyés en présence d'oxyde d'alumine (Al_2O_3 , Fluka), dont on utilise 2,5 fois le poids des cellules. Une petite quantité de deoxyribonucléase (DNase) et de ribonucléase (RNase) est ajoutée; la quantité de ces deux enzymes est de l'ordre de 0,03 mg. Le broyat est repris dans le tampon Tris-NaCl glacé (2,5 fois le poids des cellules). A la fin de cette opération, on effectue deux centrifugations : une première centrifugation de 10 min à 13.000 g à 4°C permet d'éliminer les débris cellulaires et l'alumine. Une deuxième centrifugation à 20.000 g 15 min à 4°C permet de recueillir un surnageant limpide. Ce surnageant renferme les protéines cellulaires, y compris les enzymes périplasmiques. Le taux des protéines est déterminé par la méthode de LOWRY et coll. (1951).

Système d'inactivation en milieu acellulaire

Voici en résumé la description du système complet d'inactivation acellulaire :

<u>Constituants</u>	<u>Quantité</u>
Tampon-R	100 μl
Streptomycine	100 μl
ATP	100 μl
Protéines	400 μl

Tampon-R : Tris-HCl, 0,66 M; MgCl_2 , 0,04 M; NH_4Cl , 0,4 M; mercapto-éthanol, 0,1 M; pH 8.

Streptomycine : solution de sulfate de streptomycine en tampon-R (concentration = 700 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

ATP : solution d'adénosine - 5' - triphosphate, disodium, $4\text{H}_2\text{O}$ (A Grade Calbiochem) 12,6 mg/ml; molarité : 2×10^{-2} .

Protéines : protéines obtenues à partir des souches résistantes à la streptomycine soit par la méthode du choc osmotique, soit par trituration à l'alumine.

Détermination du taux d'inactivation

Le taux d'inactivation enzymatique fut déterminé par la méthode microbiologique déjà mentionnée plus haut (PIGUET et PITTON, 1968). Le système d'inactivation acellulaire est incubé 4 heures à 37°C.

1.1.6 Induction par irradiation aux rayons ultraviolets (RUV)

Deux souches de E. coli sauvages sont ensemencées dans 10 ml de bouillon (inoculum : 2 % d'une culture en phase exponentielle). Après une incubation de 4 heures à 37°C avec agitation, on centrifuge 20 min à 7500 g. Le culot est resuspendu dans 3 ml de milieu PAM (Phage Adsorption Medium; HERSHEY and CHASE, 1952). La suspension est ensuite irradiée sous une lampe à RUV (lampe Philips 57326 E/70; 125 V; distance 10 cm). Pour établir la courbe de survie, nous avons choisi différents temps d'irradiation : 45, 60, 90 et 120 sec. Après chaque temps d'irradiation, on prélève 0,5 ml de suspension pour compter les survivants. La courbe de survie d'une de ces deux souches montre qu'après 90 sec d'irradiation, le taux de bactéries survivantes capables de se développer atteint le 10 % de l'inoculum. Par la suite, nous avons irradié ces deux souches pendant 90 sec et les protéines que nous en avons obtenues ont été utilisées pour les tests d'inactivation de la streptomycine.

1.2. RESULTATS

1.2.1 Niveau de résistance

Les essais que nous avons conduits dans différentes conditions ont permis de conclure ce qui suit :

- a) Le niveau de résistance à la streptomycine varie avec la quantité de l'inoculum. En augmentant l'inoculum, on augmente la CMI (Tableaux I et II).
- b) L'étude de 20 souches de E. coli sauvages cultivées à différents pH (7; 7,5 et 8) fait ressortir que l'élévation du pH diminue la valeur de la CMI. Pour la suite de nos recherches, nous avons constamment choisi un pH de 8.

1.2.2 Transférabilité

Parmi les 54 souches de E. coli sauvages résistantes à la streptomycine, 50 étaient capables de transférer leur déterminant de résistance, soit 92 % (Tableau III). On notera que la proportion des souches capables de transférer leur facteur de résistance à différentes souches réceptrices est variable : 80 % des souches sauvages de E. coli transfèrent leur facteur de résistance à S. typhi, 76 % à S. para B et 70 % à S. typhimurium. Dans nos conditions de travail, S. typhi lysotype A paraît être la meilleure réceptrice.

Parmi les 20 souches de salmonelles sauvages étudiées, 10 étaient capables de transférer leur caractère de résistance. Ici, ce fut la souche de E. coli K12 F⁻ 703 qui s'avéra la meilleure réceptrice.

1.2.3 Inactivation enzymatique

1.2.3.1 Système cellulaire

Par cette méthode nous avons testé 60 souches sauvages : 50 souches de E. coli et 10 souches de salmonelles. Toutes ces bactéries portaient une résistance transférable; de plus, leur CMI était comprise entre 25 et 250 µg/ml de streptomycine (Tableaux I et II).

Tableau III

Répartition de la transférabilité chez les différentes
souches réceptrices

Souches réceptrices	Nombre de souches transférables
<u>S. typhi</u> lysotype A <u>S. typhimurium</u> <u>S. paratyphi</u> B	26
<u>S. typhi</u> lysotype A <u>S. paratyphi</u> B	5
<u>S. typhi</u> lysotype A <u>S. typhimurium</u>	5
<u>S. typhimurium</u> <u>S. paratyphi</u> B	3
<u>S. typhi</u> lysotype A	4
<u>S. paratyphi</u> B	4
<u>S. typhimurium</u>	1
<u>E. coli</u> K12 F ⁻ <u>lac</u> ⁻ Nx ²	2
Total	50

Les dosages de l'antibiotique furent exécutés selon la méthode biologique de PIGUET et PITTON (1968) et présentent une variabilité d'environ 30 %. Aussi, pour l'inactivation, avons-nous adopté, comme limite de significativité des valeurs inférieures au 70 % de l'activité résiduelle.

Dans nos conditions de travail, seules 5 souches (soit 12 %) ont révélé une faible capacité d'inactiver la streptomycine, mais l'inactivation était d'environ 30 %, ne dépassant donc pas la limite de significativité. A la suite de ces résultats, pour vérifier si les constituants du système d'inactivation influençaient la réaction enzymatique, nous avons conduit nos expériences en variant certains paramètres, entre autres le milieu de culture, le pH, le temps d'incubation, la concentration de streptomycine et l'inoculum. Dans l'étude de ces différentes variables nous avons, ici encore, utilisé 60 souches. Quelle que fût la modification des paramètres, nous n'avons pas obtenu de résultat plus significatif que lors des premiers essais. Le taux d'inactivation était constamment très faible, de l'ordre de 30 % au maximum, ne dépassant donc pas la limite de significativité.

1.2.3.2 Système acellulaire

a) Choc osmotique

A la suite d'un choc osmotique, la libération des enzymes périsplasmiques commence après 5 min, dans la deuxième étape en H₂O glacée. Comme le montre la Figure 1, la quantité des protéines augmente en fonction du temps pendant lequel les cellules restent dans l'eau. Après 5 min la quantité d'enzyme libérée reste quasiment stable.

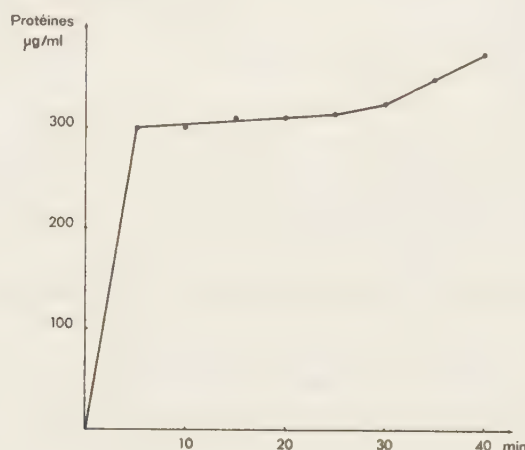


Fig. 1. Libération des protéines par choc osmotique.

Le taux des protéines varie d'une souche à l'autre; en général, il est plus élevé chez les salmonelles que chez les *E. coli* traitées dans les mêmes conditions. Cette différence pourrait s'expliquer par une meilleure perméabilité de la membrane chez les salmonelles. Le taux de protéines obtenu par choc osmotique à partir des différentes souches, déterminé par la méthode de Lowry, se situe entre 100-800 µg/ml.

b) Trituration à l'alumine

La quantité de protéines obtenue par cette méthode est beaucoup plus élevée qu'après le choc osmotique, puisque les protéines cellulaires sont libérées en même temps que les protéines périsplasmiques. La concentration de protéines se situe entre 2,7 - 15 mg/ml.

1.2.4 Cinétique de la réaction d'inactivation

Pour évaluer la cinétique de l'inactivation de la streptomycine, nous avons d'abord étudié l'influence de l'ATP dans le système d'inactivation acellulaire complet, tel qu'il a été décrit plus haut. Le système était incubé 4 heures à 37°C.

Nos essais, résumés dans la Figure 2, n'ont pas pu mettre en évidence une inactivation enzymatique en l'absence d'ATP : l'inactivation est fonction directe de la molarité de l'ATP dans le système final. Le taux d'inactivation diminue aux concentrations inférieures à 10^{-3} M d'ATP, mais ce taux n'augmente pas pour des concentrations supérieures à 10^{-2} M.

Ces résultats nous ont incité à déterminer l'inactivation dans un système standard contenant 2×10^{-3} M d'ATP. Le système d'inactivation acellulaire est

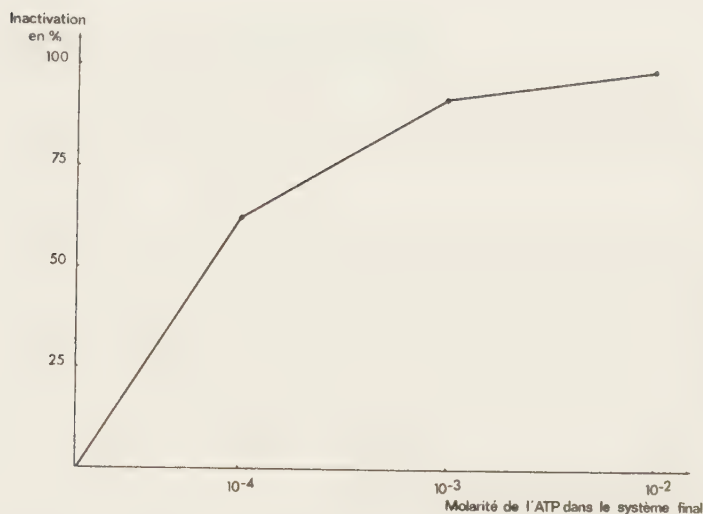


Fig.2. Influence de l'ATP sur l'inactivation de la streptomycine.

incubé à 37°C avec agitation pendant des temps variables : 15, 30, 60, 120 et 240 min. La Figure 3 montre que l'inactivation de la streptomycine est presque totale après 4 heures d'incubation.

1.2.5 Spécificité du substrat

Pour déterminer que l'enzyme ne réagit spécifiquement qu'avec la streptomycine, nous l'avons testé avec d'autres aminoglycosides : kanamycine, néomycine, gentamycine, dihydrostreptomycine. Les tests d'inactivation ont été effectués dans notre système standard acellulaire. Les résultats obtenus confirment que l'enzyme réagit seulement sur la dihydrostreptomycine et sur la streptomycine.

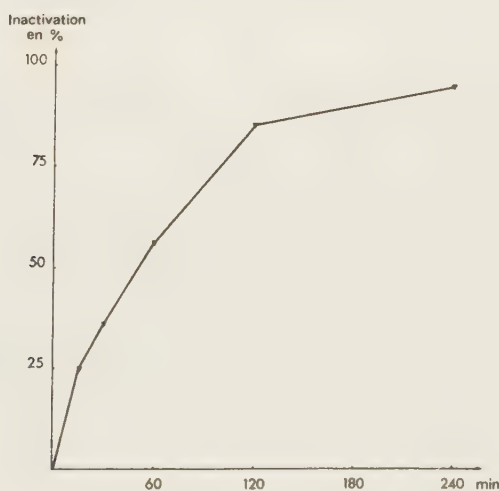


Fig.3. Cinétique de l'inactivation de la streptomycine en fonction du temps.

1.2.6 Induction de la synthèse de l'enzyme

Des 54 souches de E. coli étudiées en système acellulaire, 52 sont capables d'inactiver la streptomycine dans les conditions optimum que nous avons fixées. Les 2 souches inefficaces sur l'antibiotique sont intéressantes : elles portent un déterminant extrachromosomique, puisque leur résistance est transférable.

Selon notre hypothèse de départ, les souches portant une résistance transférable devaient leur résistance à un élément extrachromosomique et, d'une façon générale, la résistance plasmidique devait être imputée à une inactivation enzymatique. Ainsi étions-nous amenée à considérer deux possibilités :

- l'inactivation enzymatique est due à la présence d'une enzyme non décelable dans notre système standard acellulaire,
- ou bien la résistance relève d'une inactivation enzymatique, mais la quantité d'enzyme produite par nos souches est très faible, ce qui fait envisager un mécanisme de répression sur la synthèse de l'enzyme. Or la répression peut s'exercer de deux façons différentes : par la souche hôte (dans ce cas on supprimera l'effet de répression par transfert du plasmide dans une autre souche), par le plasmide lui-même (la dérégulation par un agent inducteur doit être alors possible).

Nous avons étudié ces deux possibilités.

Répression par la souche hôte

Nous avons transféré le caractère de résistance des deux souches R 70a et R 314 à des souches réceptrices de salmonelles : S. typhi A, S. paratyphi B, S. typhimurium. Les souches réceptrices, facilement rendues résistantes, ont été utilisées pour la préparation de l'enzyme responsable de l'inactivation de la streptomycine. Les résultats des tests d'inactivation en système acellulaire ont montré qu'il n'existait aucune inactivation significative parmi les souches réceptrices ayant reçu les déterminants plasmidiques.

Ces résultats excluent la possibilité d'une répression sur la synthèse d'enzyme au niveau de la souche hôte.

Répression au niveau du plasmide

Dans le but de mettre en évidence une répression de la synthèse de l'enzyme au niveau du plasmide, nous avons recouru aux effets inducteurs des RUV et irradié les deux souches R 70a et R 314. Les protéines extraites de ces souches après irradiation ont été utilisées pour les tests d'inactivation par la méthode biologique. Nous avons noté une inactivation de la streptomycine de l'ordre de 80 %. Avec les mêmes souches, sans recourir à l'induction par les RUV, on obtenait une inactivation d'environ 30 %.

Ces résultats suggèrent que la synthèse de l'enzyme est réprimée au niveau du plasmide et que l'effet inducteur des RUV supprime la répression.

1.3 DISCUSSION ET CONCLUSIONS

54 souches sauvages de E. coli et 20 souches sauvages de salmonelles résistantes à la streptomycine (soit seule, soit associée à d'autres antibiotiques

Tableau IV

Résultats des tests de transférabilité et de l'inactivation enzymatique pour 54 souches de *E. coli* sauvages

Spectre	Nombre de souches	Transférabilité		Inactivation
		+	-	+
S	5	5	0	5
ST	10	9	1	10
SA	3	3	0	3
*SC	4	4	0	4
SCT	7	6	1	7
SNx	1	1	0	1
SAT	4	3	1	4
SAC	2	2	0	2
*SACT	11	10	1	11
SACNx	1	1	0	1
SCTNx	2	2	0	2
SACTNx	4	4	0	4
Total	54	50 92,5 %	4 7,5 %	54 100 %

* Une souche de chaque groupe porte un déterminant transférable, mais la présence de l'enzyme ne peut être mise en évidence qu'après induction.
Légende : cf. Tableau I.

Tableau V

Résultats des tests de transférabilité et de l'inactivation enzymatique pour 20 souches de salmonelles sauvages

Spectre	Nombre de souches	Transférabilité		Inactivation	
		+	-	+	-
SA	3	3	0	3	0
ST	4	1	3	1	3
SAT	3	1	2	1	2
SAC	1	1	0	1	0
SACT	1	1	0	1	0
SCTSu	1	1	0	1	0
SACSu	1	1	0	1	0
SACTNx	6	1	5	3	3
Total	20	10 50 %	10 50 %	12 60 %	8 40 %

Légende : cf. Tableau I.

tels que ampicilline, chloramphénicol, tétracycline, acide nalidixique ou sulfamidés) ont été isolées de cas cliniques. Les résultats de leurs spectres de résistance, leurs caractères de transférabilité ainsi que leur inactivation enzymatique dans un système acellulaire sont résumés dans les Tableaux IV et V. Nous avons relevé que parmi les souches de E. coli étudiées, 52 étaient capables d'inactiver l'antibiotique dans un système acellulaire, sans manifestation de phénomènes d'induction. Pour deux souches cependant, dont la résistance était transférable, il fut nécessaire de procéder à une induction de la synthèse d'enzyme (par les RUV par exemple) pour mettre en évidence une inactivation significative de la streptomycine.

Il est important de noter que parmi les 52 souches chez lesquelles la synthèse de l'enzyme survenait sans induction, 4 souches n'étaient pas capables de transférer leur facteur de résistance, -dans nos conditions de travail tout au moins-. Ceci implique qu'il n'est pas possible de déterminer la localisation du gène de résistance uniquement par des tests de transférabilité, et que l'étude des réactions biochimiques est indispensable pour préciser le mode de résistance.

Le comportement des entérobactériacées étudiées semble permettre la formulation de deux hypothèses :

- 1) le facteur de transfert est défectif ou absent (ANDERSON et LEWIS, 1965);
- 2) le transfert de résistance est inhibé par des mécanismes encore inconnus pour certaines souches (ANDERSON, 1968).

Nous avons pu confirmer que la fréquence de transfert peut varier non seulement d'un genre à l'autre mais également d'une espèce à l'autre. Dans les tests de transfert effectués avec les E. coli sauvages comme donneurs, S. typhi s'est montrée la meilleure souche réceptrice.

Chez toutes les souches de E. coli sauvages que nous avons testées, la résistance est due à une inactivation enzymatique. Le gène responsable de la synthèse de cette enzyme est localisé sur un élément plasmidique. Nous n'avons pas observé de souches résistantes portant une mutation chromosomique (ribosomes résistants), telle que nous la rencontrons avec les souches de laboratoire.

Par contre, les résultats des tests d'inactivation effectués sur des salmonelles sauvages montrent que 40 % parmi elles n'inactivent pas la streptomycine; de plus, ces souches sont incapables de transférer leur facteur de résistance. Les deux caractères réunis font supposer que ces souches ne portent pas un déterminant plasmidique. Leur résistance est due probablement à une mutation chromosomique, éventualité que nous étudions dans le chapitre 3 de ce travail.

Sa libération par choc osmotique permet de classer l'enzyme responsable de l'inactivation dans le groupe des enzymes périplasmiques (NEU, 1968). La présence de cette enzyme ne peut être mise en évidence que dans un système acellulaire et non en système cellulaire. La discordance existant dans les mécanismes d'inactivation en système cellulaire et acellulaire doit être encore élucidée. Les expériences qui suivent vont nous permettre d'apporter des éléments nouveaux dans la compréhension de ce phénomène.

Chapitre 2

CARACTERISATION DE L'ENZYME RESPONSABLE DE L'INACTIVATION DE LA STREPTOMYCINE CHEZ CERTAINES SOUCHES SAUVAGES DE E. coli ET DE SALMONELLES PORTANT UN DETERMINANT PLASMIDIQUE

2.1 Introduction

2.2 Matériel et méthodes

- 2.2.1 Extraction des protéines
- 2.2.2 Chromatographie sur diéthyl-amino-éthyl-cellulose
- 2.2.3 Filtration sur gel de Séphadex
- 2.2.4 Electrophorèse sur gel de polyacrylamide
- 2.2.5 Techniques immunologiques
 - 2.2.5.1 Préparation des antisérums
 - 2.2.5.2 Immunodiffusion
 - a) Méthode d'Ouchterlony
 - b) Immunoélectrophorèse
- 2.2.6 Isoélectrofocalisation
- 2.2.7 Force ionique

2.3 Résultats

- 2.3.1 Elution de l'enzyme sur DEAE-cellulose
- 2.3.2 Poids moléculaire
- 2.3.3 Point isoélectrique
- 2.3.4 Antigénicité

2.4 Discussion et conclusions

2.1 INTRODUCTION

Les premières analyses détaillées de l'inactivation de la streptomycine par des systèmes enzymatiques sous contrôle de gènes extrachromosomiques ont été publiées par YAMADA et coll. (1968). Ces auteurs ont montré que la réaction enzymatique consiste en une adénylation. OZANNE et coll. (1969) ont reconnu l'existence de deux enzymes différentes capables d'inactiver la streptomycine : une adényl-synthétase et une phosphorylase. Ces deux enzymes sont ATP dépendantes et réagissent avec le même radical de la molécule de streptomycine. BENVENISTE et coll. (1970) ont repris l'étude de l'enzyme adényl-synthétase sans pouvoir cependant la caractériser définitivement.

Dans cette partie de notre travail, nous avons cherché à préciser certains caractères de l'enzyme responsable de l'inactivation de la streptomycine chez quelques souches sauvages de E. coli et de salmonelles. Nous avons en particulier cherché à déterminer si l'enzyme responsable de l'inactivation

de la streptomycine était identique pour les deux genres. A cette fin, nous avons utilisé les méthodes courantes de purification et de caractérisation des protéines, notamment la chromatographie, les gels de polyacrylamide, les techniques immunologiques et l'isoélectrofocalisation.

2.2 MATERIEL ET METHODES

2.2.1 Extraction des protéines

Les souches utilisées pour préparer les protéines sont :

1. Une souche sauvage de E. coli : R224
2. Une souche sauvage de S. typhimurium : RS131
3. Une souche de E. coli K12 portant un déterminant extrachromosomique provenant d'une souche de S. typhimurium : K12 (RT1).

Les souches ont été choisies pour leur haut niveau de résistance à la streptomycine et une forte activité enzymatique, caractères analysés dans la première partie de notre travail.

Les germes sont cultivés en bouillon synthétique (20 litres). On arrête la croissance bactérienne en phase logarithmique en plaçant la culture à 4°C. On effectue une centrifugation en continu à 20.000 g et recueille les culots. 20 litres de culture fournissent en moyenne 40 g de bactéries. Après congélation, les culots sont utilisés pour la préparation des extraits cellulaires qui contiennent l'enzyme responsable de l'inactivation de la streptomycine. La méthode utilisée est celle de la trituration des cellules congelées avec de l'alumine (TISSIERES et coll., 1959).

2.2.2 Chromatographie sur diéthyl-amino-éthyl-cellulose (DEAE)

Les extraits cellulaires renfermant l'enzyme responsable de l'inactivation de la streptomycine sont séparés par chromatographie sur diéthyl-amino-éthyl-cellulose (DEAE). Dans ces expériences, le rapport protéines/gel utilisé a été de 10 mg de protéines pour 2 g de gel.

L'échantillon est appliqué sur la colonne de DEAE (28 cm de long sur 1 cm de diamètre), équilibrée par un tampon Tris 0,01 M, pH 7,8 (tampon initial). L'élution s'effectue avec un gradient linéaire continu de concentrations de NaCl. Tampon final : Tris 0,01 M, pH 7,8; NaCl 6 M. La vitesse d'élution est réglée à 60 ml/h au moyen d'une pompe péristaltique. A la sortie de la colonne, le liquide est recueilli par fractions de 4,4 ml. La densité optique est déterminée par passage continu à travers un Uvicord (280 nm). L'activité enzymatique de chaque fraction est déterminée par la méthode biologique décrite au chapitre 1. Toutes les fractions enzymatiquement actives sont lyophilisées après dialyse contre le tampon initial et sont utilisées dans les étapes suivantes.

2.2.3 Filtration sur gel de Séphadex

La filtration est exécutée à travers une colonne de Séphadex G75 (80 cm de longueur et diamètre de 2,5 cm) équilibrée avec le tampon d'élution soit Tris 0,01 M, NaCl 0,3 M, pH 7,8. Pour une colonne de ce diamètre, on applique 2 ml de l'échantillon à examiner. L'élution est réalisée par une méthode ascendante avec un débit constant de 30 ml/h, réglé par une pompe péristaltique. A la sortie de la colonne, on recueille des fractions de 3 ml. La densité

optique et l'activité enzymatique sont mesurées selon la technique décrite au paragraphe précédent.

2.2.4 Electrophorèse sur gel de polyacrylamide

Les gels de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS) ont été préparés selon la méthode de WEBER et OSBORN (1969) et de AHMAD-ZADEH et coll. (1971). Les solutions suivantes furent utilisées dans la préparation de ces gels:

- Solution de 22 g d'acrylamide et de 0,6 g de méthylène bis acrylamide dans 100 ml H₂O. Les substances non solubles sont éliminées par filtration sur papier Whatman No. 1.
- Tampon pour gel 0,2 M : (par litre) NaH₂PO₄ · H₂O, 7,8 g; Na₂HPO₄ · 7H₂O, 38,6 g; SDS 2 g.
- Solution de persulfate d'ammonium à la concentration de 1 %.
- Tétraméthylènediamine.
- Tampon de réservoir 0,1 M : (par litre) NaH₂PO₄ · H₂O, 3,9 g; Na₂HPO₄ · 7H₂O, 19,3 g; SDS 1 g.
- Colorant bleu de coomasie : (par litre) bleu de coomasie 2,5 g; méthanol 454 ml; acide acétique 92 ml; H₂O, 454 ml.
- Décolorant : (par litre) méthanol 75 ml; acide acétique 50 ml; H₂O, 875 ml.

Voici les constituants nécessaires à la préparation des 12 gels :

<u>Constituants</u>	<u>Quantités</u>
. Solution d'acrylamide	13,5 ml
. Tampon pour gel	15 ml
. Persulfate d'ammonium à 1 %	1,5 ml
. Tétraméthylènediamine	0,03 ml

Les tubes utilisés pour ces gels ont un diamètre de 6 mm et une longueur de 10 cm.

100 µl de solution protéinique (0,2 - 0,5 mg/ml) dialysée contre le tampon Tris 0,01 M, pH 7,8, sont additionnés de mercaptoéthanol et de SDS avec une concentration finale de 0,1 %. L'échantillon est bouilli pendant 1 min. Après refroidissement, on ajoute 0,02 % de bleu de bromophénol en glycérol - H₂O à 50 %. La concentration finale de ce dernier colorant est de 0,003 %. On applique 100 µl de chaque échantillon par gel. L'électrophorèse dure 4 heures sous courant constant de 8 mA par gel. On colore ensuite pendant 2 heures par le bleu de coomasie, puis on décolore par électrophorèse au moyen d'un courant électrique perpendiculaire à l'axe longitudinal des gels.

2.2.5 Techniques immunologiques

2.2.5.1 Préparation des antisérums

Les préparations enzymatiquement actives et partiellement purifiées (chromatographie des extraits cellulaires sur DEAE-cellulose suivie d'une filtration sur gel de Séphadex) obtenues de trois différentes souches (cf. Matériel et méthodes), sont utilisées comme antigènes. Ces préparations possèdent au moins 5 - 6 bandes de polypeptides à l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS. Les antigènes provenant de la souche sau-

vage de E. coli R224 et de E. coli K12 portant un déterminant plasmidique issu lui-même d'une souche sauvage de S. typhimurium sont utilisés pour l'immunisation de lapins; l'antigène obtenu à partir de la souche sauvage de salmonelle RS131 sert à l'immunisation de cobayes. Les animaux reçoivent 4 injections. La première, intramusculaire, est faite avec l'adjuvant complet de Freund (1 volume d'adjuvant pour 1 volume d'antigène). La seconde injection est faite 3 semaines plus tard; sous-cutanée, elle comporte l'antigène avec l'adjuvant de Freund incomplet; une troisième et une quatrième injection sont appliquées dans les mêmes conditions, chaque fois après une semaine. 8 jours après la dernière injection, les animaux sont saignés. Les sérums, recueillis et traités selon les techniques usuelles sont conservés à -20°C jusqu'au moment de l'emploi.

Les préparations enzymatiquement actives utilisées pour la préparation des antisérums n'étaient que partiellement purifiées, il était donc nécessaire d'absorber les anticorps non spécifiques. Nous devions, dans ce but, utiliser des protéines cellulaires extraites de variants sensibles choisis parmi des souches sauvages résistantes à la streptomycine. Toutefois, à partir de la souche sauvage de E. coli que nous avons choisie pour nos expériences, il ne nous a pas été possible d'obtenir un variant sensible, ni spontanément, ni après traitement avec des agents connus pour inhiber la réplication des plasmides tels que les RUV (ANDERSON et coll., 1968), le bromure d'éthidium (BOUANCHAUD et coll., 1968) ou les dérivés d'acridine (MITSUHASHI et coll., 1961 a et b). Nous avons alors choisi, pour l'absorption, les protéines extraites d'une souche de laboratoire de E. coli K12 - 703F- str^S. Après absorption, le surnageant sert comme source d'anticorps spécifiques anti-enzyme.

2.2.5.2 Immunodiffusion

Les tests d'immunodiffusion ont été effectués selon les méthodes suivantes :

a) Méthode d'Ouchterlony

La technique utilisée est celle d'Ouchterlony (1953). Sur des plaques de 8x10 cm, nous coulons une couche de 1 mm de gélose (Agar Noble) à 2 % en tampon de Véronal à pH 8,2, force ionique 0,05. Après solidification, on dispose des trous équidistants à l'aide d'un emporte-pièce. La disposition géométrique des antigènes (dilutions 1:1, 1:2, 1:3, 1:4) et des anticorps (dilutions 1:1, 1:2, 1:4, 1:8) est donnée dans la Figure 4.

Parallèlement, nous avons préparé des plaques dans les mêmes conditions, mais avec le sérum non absorbé.

Après 24 heures de diffusion en chambre humide, les plaques sont lavées pendant 24 heures (pour 1 litre de liquide de lavage : NaCl, 9 g; NaN₃, 0,5 g; H₂O q.s.). Ces plaques sont rincées à l'eau distillée, séchées, colorées pendant 15 min au bleu de coomasie (cf. 2.2.4), puis décolorées pendant 5-10 min. par une solution de méthanol, 7 Vol; acide acétique, 1 Vol; H₂O, 3 Vol.

b) Immunoélectrophorèse

La technique est celle de SCHEIDEGGER (1955). Nous avons utilisé la même gélose que pour le test d'Ouchterlony. On prépare des lames de 7,6 x 2,6 cm recouvertes par 1 mm de gélose. Après refroidissement, on ménage à l'aide d'un emporte-pièce deux fentes parallèles qui recevront les antisérums

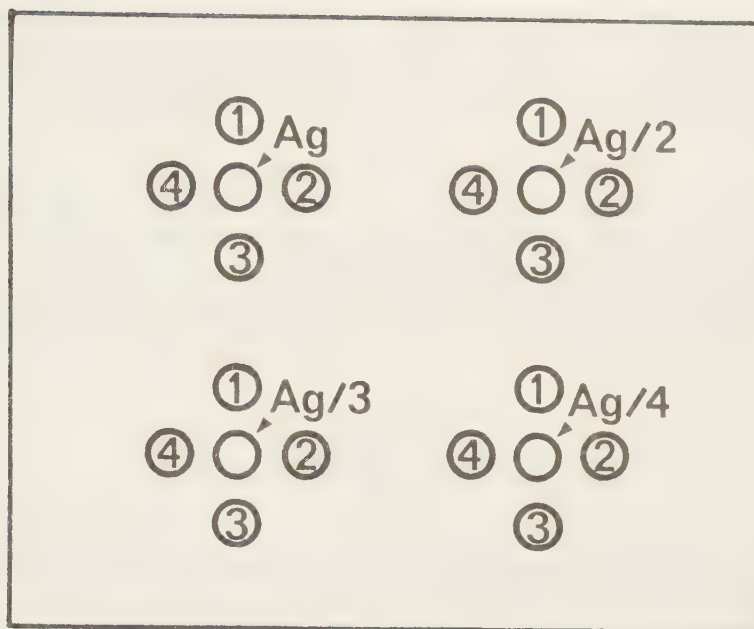


Fig.4. Disposition des dilutions d'antigènes et d'immunsérums dans le test d'immunodiffusion selon Ouchterlony.

Légende :

- 1 - Sérum absorbé non dilué
- 2 - Sérum absorbé dilué : 1/2
- 3 - Sérum absorbé dilué : 1/4
- 4 - Sérum absorbé dilué : 1/8

Ag - antigène, extrait cellulaire contenant l'enzyme aux dilutions 1, 1/2, 1/3, 1/4.

absorbés et non absorbés ainsi qu'un trou médian destiné à l'antigène. Les dilutions d'antigène choisies sont les mêmes que pour le test d'Ouchterlony.

Les lames renfermant l'antigène sont soumises à un courant constant de 6V/cm; le tampon pour l'électrophorèse est identique à celui décrit pour les gels.

Après 45 min, on aspire les deux bandes de gélose préalablement découpées; on remplit alors l'une des fentes avec l'antisérum non absorbé et l'autre avec l'antisérum absorbé. Après 24 heures de diffusion en chambre humide, suivies d'un lavage de 24 heures, les lames sont séchées, puis colorées et décolorées (cf. méthode d'Ouchterlony).

2.2.6 Isoélectrofocalisation

La méthode est celle de VESTERBERG et SVENSSON (1966). On prépare une colonne (LKB) d'une capacité de 110 ml, conformément aux instructions données par le fabricant. La colonne contient 1,25 % d'ampholytes pour des pH compris entre 3 - 6 en gradient de saccharose de 0 à 50 %. L'échantillon, 2 - 20 mg de protéines en solution aqueuse, est introduit dans la solution légère du gradient. A la cathode, la solution à 0,2 % d'éthylendiamine renferme 52 % de saccharose; à l'anode, nous avons une solution à 1 % de H_3PO_4 . L'opération s'effectue à une température de 8°C avec un voltage constamment réglé pour que la puissance ne dépasse pas 3 W. Dans nos conditions d'expérience, l'intensité devenait stable après 72 heures.

La focalisation terminée, on recueille des fractions de 2 ml. Le pH de ces fractions est mesuré avec une précision au centième. L'activité biologique de ces fractions est alors déterminée par la méthode biologique décrite au chapitre 1.

2.2.7 Force ionique

La force ionique des fractions après chromatographie sur DEAE-cellulose fut évaluée par des mesures de résistivité, la droite standard étant établie au moyen de concentrations de NaCl (0,1; 0,2 0,6 M) en tampon initial (Tris 0,01 M, pH 7,8).

2.3 RESULTATS

Pour caractériser l'enzyme responsable de l'inactivation de la streptomycine, nous avons utilisé les préparations enzymatiquement actives obtenues de 3 souches (la souche de E. coli sauvage R224, une souche de salmonelle sauvage RS131 et une souche de E. coli K12 portant un déterminant plasmidique lui-même issu de la souche de S. typhimurium RT1. Ces préparations ont été obtenues après deux cycles de chromatographie sur DEAE-cellulose suivis d'une filtration sur gel de Séphadex G75. La pureté de ces fractions était contrôlée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (cf. Matériel et méthodes). En appliquant 200 µg de chaque préparation enzymatiquement active, nous avons observé 4 - 6 bandes de chaînes polypeptidiques d'une intensité plus ou moins identique. Nous n'avons pas pu définir une ligne majeure qui eût correspondu au pic d'activité enzymatique. Nous n'avons pas, non plus, pu mettre en évidence la présence de l'enzyme en recourant à une méthode combinée : technique biologique associée à l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en absence de détergent (SDS) selon PITTON (1972). Des expériences complémentaires nous ont montré que l'acrylamide elle-même inhibait l'activité enzymatique.

Nous n'avons pas pu pousser plus avant la purification puisque toutes les opérations réalisées après les deux cycles de chromatographie entraînaient une disparition de l'activité enzymatique. Des résultats semblables ont été retrouvés chez les différentes souches, au cours de plusieurs séries d'expériences.

Aussi avons-nous tenté de caractériser et de comparer cette enzyme chez nos souches R224, RS131 et K12 (RT1) par d'autres méthodes.

2.3.1 Elution de l'enzyme sur DEAE-cellulose

La Figure 5 montre le profil d'un extrait cellulaire après chromatographie sur DEAE-cellulose; l'extrait fut réalisé par trituration à l'alumine (cf. Matériel et méthodes) d'une souche sauvage de E. coli R224 porteuse d'une résistance transférable.

La mesure de la force ionique des fractions fait apparaître que les fractions enzymatiquement actives d'après la méthode biologique sont éluées à une molarité comprise entre 0,27 - 0,32 M de NaCl. Le maximum d'activité correspond à une force ionique de 0,3 M de NaCl.

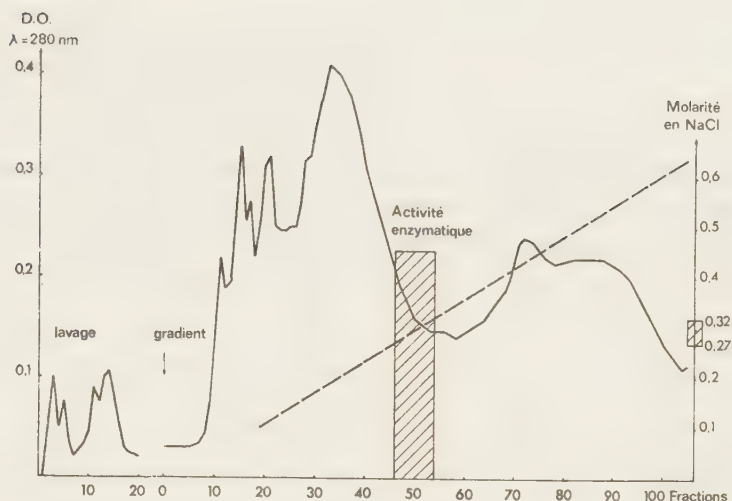


Fig.5. Chromatographie des extraits cellulaires (8 mg) d'une souche sauvage de *E. coli* porteuse d'une résistance transférable. Colonne de DEAE : 28 cm x 1 cm. Gradient linéaire de 460 ml (Tris 0,01 M, pH 7,8 et Tris 0,01 M, NaCl 0,6 M, pH 7,8) soumis à une vitesse de 60 ml/h. Fractions collectées : 4,4 ml.

- : Densité optique, 280 nm
 --- : Gradient de force ionique
 ▨ : Activité enzymatique.

Les caractéristiques de la force ionique ont été déterminées pour les trois souches mentionnées précédemment; pour chaque souche trois séries d'expériences indépendantes ont été conduites. Nous avons constaté que les profils de densité optique à 280 nm étaient identiques lors de la répétition de l'expérience pour une souche donnée. Par contre les profils de la souche sauvage de salmonelle RS131 et de *E. coli* K12 (RT1) ne sont pas superposables à celle de *E. coli* R224.

2.3.2 Poids moléculaire

Le poids moléculaire de cette enzyme inactivatrice de la streptomycine a été déterminé par filtration sur gel de Séphadex (ANDREWS, 1964). Le procédé est basé sur le fait que l'élution des protéines a lieu dans un certain ordre, lui-même fonction logarithmique du poids moléculaire (ANDREWS, 1965).

Des essais avec différents gels de Séphadex : G200, G150, G100, G75 et G50 ont fait ressortir que le gel de Séphadex G75 possède le meilleur pouvoir de résolution pour l'enzyme à l'étude. Nous avons travaillé avec une série de quatre protéines de référence pour établir la droite étalon :

<u>Protéine étalon</u>	<u>Poids moléculaire</u>
myoglobuline	17.200
ovalbumine	43.000
sérumalbumine de boeuf	68.000
immunoglobuline G	
(humaine, étalon du Dr Ahmad-Zadeh)	150.000

Lors de l'emploi du gel G75, les molécules de masse supérieure à 70.000 environ sont exclues. Nous avons néanmoins utilisé les immunoglobulines G pour déterminer le volume mort de la colonne.

La Figure 6 résume les conditions dans lesquelles se fait l'évaluation du poids moléculaire de l'enzyme inactivatrice de la streptomycine. Le PM que nous avons trouvé est 31.000 ± 1000 . Cette valeur est une moyenne calculée sur des protéines extraites de trois souches bactériennes, chaque souche ayant fait elle-même l'objet de trois expériences.

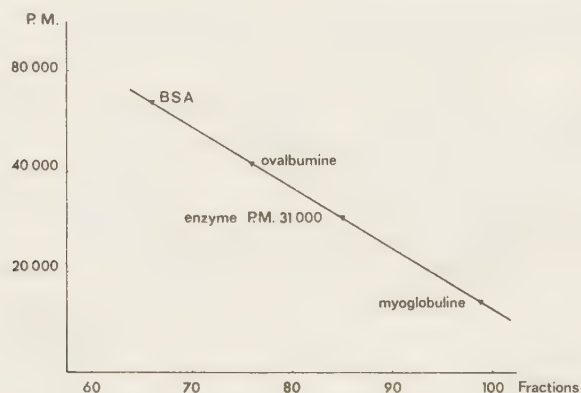


Fig.6. Détermination du PM de l'enzyme responsable de l'inactivation de la streptomycine. Souche sauvage de *E. coli* portant une résistance transférable. Filtration sur gel de Séphadex G 75. Colonne: $80 \times 2,5$ cm. Equilibration avec tampon Tris 0,01 M, NaCl 0,3 M, pH 7,8. Vitesse d'élution 30 ml/h. Volume des fractions: 3 ml. Protéines de références: cf. Figure 6.

2.3.3 Point isoélectrique

En utilisant toujours les mêmes trois souches, nous avons trouvé que le point isoélectrique de l'enzyme inactivatrice de la streptomycine se situait à un pH compris entre 4,68 et 4,88. La Figure 7 montre les conditions dans lesquelles le point isoélectrique a été déterminé. Ces résultats concordent avec ceux qui se rapportent à la propriété d'élution de l'enzyme sur DEAE-cellulose.

2.3.4 Antigénicité

Aussi bien par la technique d'Ouchterlony que par immunoélectrophorèse, nous avons observé de nombreuses lignes de précipitation avec les sérums non absorbés. Nous expliquons ces résultats par l'existence, chez le lapin non immunisé, d'anticorps spécifiques contre certaines protéines de *E. coli*. Nos préparations protéiniques n'étaient, elles aussi, que partiellement pures, chacune contenant au minimum 4 - 6 chaînes polypeptidiques.

Pour mettre en évidence l'anticorps spécifiquement anti-enzyme, nous avons répété les tests d'immunoprécipitation avec des sérums absorbés par les protéines extraites d'une souche de *E. coli* K12 *str*^S. L'absence de lignes de précipitation avec les sérums de lapins absorbés nous a amenée à immuniser des cobayes avec l'enzyme que nous avons partiellement purifiée. Nous n'avons pas non plus pu mettre en évidence un anticorps anti-enzyme dans le sérum de cobaye.

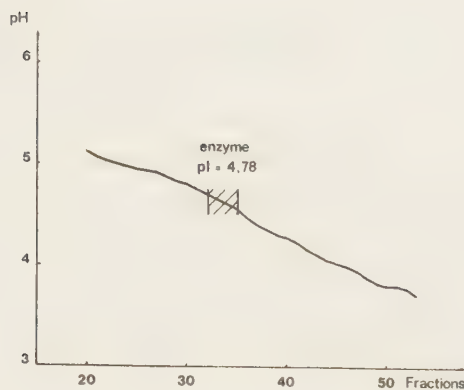


Fig.7. Détermination du point isoélectrique de l'enzyme inactivatrice de la streptomycine. Souche : *E. coli* sauvage R224 porteuse d'une résistance transférable. Capacité de la colonne : 110 ml. Ampholytes 1,2 %, pH 3 à 6. Gradient de saccharose 0 - 50 % (80 ml). Echantillon : environ 8 mg de protéines enzymatiquement actives en solution aqueuse; passage préalable sur gels de Séphadex. Durée d'électrofocalisation : 72 h. Puissance : début 2,1 W, fin 1,1 W. Volume des fractions : 2 ml.

 : activité enzymatique.

2.4 DISCUSSION ET CONCLUSIONS

L'impossibilité d'obtenir des préparations enzymatiquement actives et hautement purifiées a limité notre étude. En particulier nous n'avons pas pu déterminer si, pour les différentes souches, l'enzyme inactivatrice était indubitablement identique. Néanmoins, la localisation de l'enzyme, ses propriétés d'élution, son poids moléculaire, son point isoélectrique, son pouvoir antigénique se sont révélés être les mêmes pour toutes les souches étudiées.

L'ensemble des résultats obtenus dans ce chapitre 2 est résumé dans le Tableau VI. La détermination du poids moléculaire de l'enzyme isolée à partir de 3 souches différentes démontre une homogénéité remarquable. En effet, chez ces 3 souches l'enzyme possède un poids moléculaire, déterminé par filtration sur Séphadex, de l'ordre de 31.000.

Tableau VI

Caractéristiques de l'enzyme inactivatrice de la streptomycine

Localisation	: périplasmique
Force ionique d'élution sur DEAE-cellulose	: 0,27 - 0,32 molarité en NaCl
Point isoélectrique	: $4,68 < pI < 4,88$
Poids moléculaire	: 31.000 ± 1000
Pouvoir immunogène	: non détecté

La charge de cette protéine est également très semblable chez les différentes souches étudiées. L'élution sur DEAE-cellulose au moyen d'un gradient linéaire de NaCl se produit à une force ionique de 0,3, ce qui correspond à une molarité comprise entre 0,27 - 0,32 M de NaCl.

La détermination du point isoélectrique (4,68 - 4,88) corrobore parfaitement ces propriétés d'élution et représente un autre facteur de similitude quant au comportement physico-chimique de la protéine étudiée.

Il convient de rappeler que chez toutes les souches sauvages d'entérobactéries qui servirent aux essais relatés dans la première partie de notre travail, l'enzyme pouvait être obtenue aussi bien par choc osmotique que par trituration à l'alumine. Cette enzyme, libérée par choc osmotique, doit être définitivement classée dans le groupe des enzymes périsplasmiques.

Il nous fut impossible de provoquer la synthèse d'anticorps capables de précipiter spécifiquement l'enzyme, même si l'on utilisait des préparations partiellement purifiées et enzymatiquement actives. Ces échecs sont survenus aussi bien avec des sérums de lapins qu'avec des sérums de cobayes. Ces constatations nous amènent à formuler certaines hypothèses sur la structure de l'enzyme.

L'ubiquité des enzymes ATP dépendantes dans la nature et leur similitude structurale peuvent expliquer le faible pouvoir immunogène de l'enzyme. Il est aussi possible que l'enzyme soit constituée par des sous-unités et que les manipulations au cours des étapes de purification entraînent finalement, soit une scission en sous-unités non immunogènes, soit une déformation de la molécule de protéine. On peut encore supposer que l'enzyme n'est pas reconnue comme antigène dans les deux espèces d'animaux que nous avons choisis : lapins et cobayes.

La purification de l'enzyme responsable de l'inactivation de la streptomycine se heurte à des problèmes complexes. En effet, les manipulations effectuées après chromatographie sur DEAE-cellulose suivie d'une filtration sur gel de Séphadex entraînent une disparition de l'activité enzymatique. Cette difficulté d'obtenir une enzyme pure nous suggère elle aussi certaines hypothèses.

Nous avons observé que l'activité enzymatique se manifestait également lors d'une faible dilution -de l'ordre de 1 : 50- des protéines brutes; on peut alors supposer que la perte d'activité serait imputable à la synthèse de très faibles quantités d'enzyme par cellule bactérienne, quantités néanmoins capables de conférer au germe un haut niveau de résistance.

Chacun sait qu'au fil de la purification des protéines, le risque de dénaturation augmente avec le degré de pureté. Il se pourrait que certaines protéines bactériennes autres que l'enzyme exercent un effet protecteur sur l'activité biologique de l'enzyme, effet qui disparaîtrait soit au cours des étapes de purification, soit même au cours de la dilution de préparations plus ou moins purifiées et renfermant l'enzyme.

Chapitre 3

DISTRIBUTION GENETIQUE DE LA RESISTANCE A LA STREPTOMYCINE EN FONCTION DU LOCUS A OU DU LOCUS B CHEZ LES SOUCHES SAUVAGES DE SALMONELLES PORTANT UNE MUTATION CHROMOSOMIQUE

3.1 Introduction

3.2 Matériel et méthodes

3.2.1 Souches bactériennes

3.2.2 Préparation des ribosomes

a) Concentration de S100

b) Purification des ribosomes

3.2.3 Préparation de l'ARN du phage R17

3.2.4 Synthèse de chaînes polypeptidiques 'in vitro'

a) Synthèse dirigée par le messenger poly U

b) " " " l'ARN du phage R17

3.3 Résultats

3.4 Discussion et conclusions

3.1. INTRODUCTION

SPEYER et coll. (1962), ainsi que TAYLOR et TROTTER (1967) ont montré que chez E. coli K12 le locus responsable du contrôle des réactions à la streptomycine (streptomycine-résistance, streptomycine-sensibilité et streptomycine-dépendance) se situait dans la région correspondant à la 64ème min du chromosome bactérien; cette région est appelée locus A (strA). Le gène qui nous intéresse se trouve entre les marqueurs aroE et argD (cf. Tableau VII).

Tableau VII

Abréviations utilisées pour la désignation de gènes de synthèse

Gène	responsable de la synthèse de
<u>aroE</u>	5 - déhydrokinase
<u>argD</u>	ornithine - transcarbamylase
<u>argG</u>	acétylornithineδ - transaminase
<u>aroC</u>	5 - déhydroshikimate-réductase
<u>hisS</u>	histidyl-ARNt-synthétase

Etudiant la synthèse 'in vitro' de chaînes polypeptidiques et utilisant des ribosomes en provenance de souches sensibles et résistantes, FLAKS et coll. (1962) ont démontré que la résistance contrôlée par ce gène se manifestait au niveau des ribosomes. Pour SANDERSON et DEMEREC (1965) ainsi que pour SANDERSON (1967), chez S. typhimurium LT2, le contrôle de la résistance à la streptomycine dépend de deux gènes différents :

1) Le gène A correspond au locus strA de E. coli K12, gène localisé dans la région 108 près des loci argG et aroC. YAMADA et DAVIES (1971) ont établi que dans ce cas la résistance se manifeste au niveau des ribosomes, ce qui est le cas chez E. coli K12.

2) Le gène B est situé dans la région 80, près du locus hisS. Chez les souches portant cette mutation le mode de résistance n'est pas exactement défini; il ne s'agit pas d'une résistance au niveau des ribosomes, car ceux-ci sont sensibles à l'action de la streptomycine dans un système de synthèse de polypeptides 'in vitro'. YAMADA et DAVIES (1971) ont attribué ce mode de résistance à une modification au niveau de la membrane cellulaire.

Nous nous sommes intéressée à la distribution de la résistance en fonction du locus A ou du locus B chez des souches sauvages de salmonelles résistantes à la streptomycine et portant une mutation chromosomique. Nous nous sommes basée sur l'hypothèse de YAMADA et DAVIES (1971), à savoir que, dans un système de synthèse de chaînes polypeptidiques, les souches possédant des ribosomes résistants à la streptomycine doivent leur résistance à une mutation sur le locus A et les souches portant des ribosomes sensibles doivent leur résistance à une mutation sur le locus B. Nous avons effectué des tests de synthèse de chaînes polypeptidiques dans des systèmes dirigés par le poly U ou l'ARN R17.

3.2 MATERIEL ET METHODES

3.2.1 Souches bactériennes

Pour différencier les deux modes de résistance à la streptomycine, nous avons choisi des souches sauvages de salmonelles hautement résistantes, chez lesquelles la résistance n'était pas transférable et qui, de plus, étaient dépourvues de l'enzyme inactivatrice de la streptomycine. Ces deux caractères nous ont suggéré que leur résistance était due à une mutation chromosomique. Les souches étudiées furent les suivantes:

RS 161 :	<u>S. enteritidis</u>
RS 81 :	<u>S. brandenburg</u>
RS 114 :	"
RS 262 :	<u>S. typhimurium</u>
RS 312 :	"
RS 315 :	"
RS 300 :	<u>S. panama</u>
RS 191 :	"
RS 371 :	<u>S. bareilly</u>

Dans chaque série d'expériences, nous avons utilisé 4 souches de référence pour tester l'efficacité du système de synthèse de chaînes polypeptidiques :

- a) *E. coli* K12 MRE 600 lac^+ RNase_1^- str^S
- b) *E. coli* K12-712 lac^- pro^- his^- try^- str^R F^-
- c) *E. coli* K12-703 F^- str^S
- d) *E. coli* K12-703 F^- (RT1) : *E. coli* K12 portant un déterminant plasmidique issu d'une souche sauvage de *S. typhimurium*.

3.2.2 Préparation des ribosomes

Les bactéries sont cultivées en bouillon synthétique. Lorsque la croissance bactérienne atteint la phase logarithmique, on l'arrête par transfert dans un bain de glace. La culture est alors soumise à une centrifugation en continu à 20.000 g. Les culots recueillis sont lavés deux fois en tampon TMK 50/30. Ce tampon contient : Tris-HCl, 10^{-2} M; $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$, 10^{-3} M et KCl, 10^{-1} M; pH 7,8. Ce même tampon sera utilisé dans la préparation des ribosomes pour obtenir une scission en sous-unités 50S et 30S.

Les cellules congelées (10 g) sont placées dans un mortier préalablement refroidi à -18°C . On ajoute 25 g d'alumine refroidie et on broie les cellules de façon à obtenir une pâte luisante. On met 25 ml de TMK 50/30 et environ 0,03 mg de DNase (Calbiochem, électrophorétiquement pure, dépourvue de RNase). Par une centrifugation de 5 min à 13.000 g, on élimine les débris cellulaires et l'alumine. Le surnageant est centrifugé pendant 20 min à 30.000 g. Après décantation, on effectue une nouvelle centrifugation pendant 4 1/2 heures à 100.000 g. Le surnageant ainsi obtenu est désigné S100. Le culot est constitué par les ribosomes bruts.

a) Concentration de S100

Le S100 est dialysé au moins 10 heures contre un tampon : Tris-HCl, 10^{-2} M; $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$, 10^{-2} M; et KCl, 10^{-1} M; pH 7,8, ce qui permet d'éliminer les acides aminés dont la présence pourrait être gênante dans la synthèse de chaînes polypeptidiques 'in vitro'. La dialyse terminée, le sac à dialyse est introduit dans un bécher, puis recouvert par du polyéthylène glycol 6.000 (BDH Chemical Ltd.); le but de cette dernière opération est d'obtenir le S100 concentré au moins 4 fois. On centrifuge ensuite 5 min à 12.000 g pour éliminer les protéines qui se sont dénaturées au cours des opérations précédentes.

b) Purification des ribosomes

Les culots obtenus après centrifugation à 100.000 g sont resuspendus dans le tampon TMK 50/30 à l'aide d'une baguette de verre. Après homogénéisation, cette suspension est centrifugée 5 min à 12.000 g.

La purification des ribosomes se fait par passage sur un coussin de saccharose. A 2,5 ml d'une solution contenant 10 % de saccharose en tampon TMK 50/30, on ajoute 2,5 ml de la suspension de ribosomes et centrifuge 5 1/2 heures à 250.000 g max. Le culot ainsi obtenu est dissous dans le tampon TMK 50/30, puis centrifugé 5 min à 12.000 g.

Un aliquot de cette suspension de ribosomes est dilué dans le tampon TMK 50/30; sa densité optique est lue à 260 nm contre le même tampon. La concentration en ribosomes est déterminée sur la base de : 1 DO = 60 μg de ribosomes (TISSIERES et coll., 1959).

3.2.3 Préparation de l'ARN du phage R17

L'extraction de l'ARN a été faite selon la méthode de CAPECCHI (1966). 50 mg de phage pur, dont nous devons la préparation à l'amabilité de Monsieur J.C. Piffaretti ont été utilisés. Dans une première étape, les phages purifiés sont suspendus dans 5 ml de tampon acétate : NaCl, 10^{-1} M; CH_3COONa , 10^{-2} M; pH 5; on ajoute 50 μl d'une solution aqueuse de dodécylsulfate de sodium à 10% et laisse réagir pendant 1 min à $+4^\circ\text{C}$. Puis, pour l'extraction de l'ARN lui-même, 5 ml de phénol saturé par le tampon acétate sont ajoutés à la suspension phagique. Le mélange est agité avec précaution pendant 10 min à $+4^\circ\text{C}$, puis centrifugé 30 min à 2.000 g afin que soit réalisée une bonne séparation des deux phases.

Ces opérations se répètent de façon analogue au cours des quatre étapes de l'extraction, dont voici le schéma complet :

```
première étape :
```

phase aqueuse (1) : conservée pour la 3ème étape
phase phénolique (1) : → 2ème étape

deuxième étape :

phase phénolique (1) + tampon	:	
phase aqueuse (2)	:	conservée pour la 3ème étape
phase phénolique (2)	:	éliminée

troisième étape :

phase aqueuse (1) + phase aqueuse (2) +
phénol saturé :
phase aqueuse (3) : conservée
phase phénolique (3) : → 4ème étape

quatrième étape :

phase phénolique (3) + tampon	:	
phase aqueuse (4)	:	conservée
phase phénolique (4)	:	éliminée

Les phases aqueuses 3 et 4 sont utilisées pour la suite des opérations.

On procède maintenant, sur l'ensemble de ces deux dernières phases aqueuses, à 3 précipitations successives par l'éthanol absolu refroidi à -18°C . Après adjonction d'un volume d'éthanol double de celui des phases aqueuses, on place le tout à -18°C pendant 20 min et centrifuge pendant 20 min à 2000 g. Le culot est repris dans le tampon acétate, puis précipité une deuxième fois par l'alcool absolu à -18°C pendant 16 heures. Après centrifugation de 30 min à 2000 g, on procède à la dernière précipitation pendant 20 min à -18°C . Nouvelle centrifugation, puis le culot est drainé pendant 45 min à $+4^{\circ}\text{C}$ (élimination de l'alcool résiduel) et dissous dans un tampon CH_3COONa , 10^{-3} M , pH 4,6.

Un aliquot de cette préparation est dilué dans le même tampon et sa densité optique est lue à 260 nm. La concentration en ARN est déterminée sur la base de : 1 DO = 43 µg d'ARN (MITRA et coll., 1963).

L'homogénéité et la pureté du RNA du phage R17 ont été contrôlées par la méthode de BOEDTKER (1968).

Une solution de formaldéhyde à 35 % est ramenée à 30 % par adjonction de 1/6ème de son volume de tampon : $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,45 M; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,05 M. Un volume de cette solution est ajouté à 9 volumes d'une solution d'ARN en tampon CH_3COONa , 10^{-3} M; pH 4,6 contenant 50-200 μg d'ARN. L'ensemble est porté à 63°C pendant 15 min, puis refroidi immédiatement dans la gla-

ce. On applique 200 μg d'ARN ainsi traité sur un gradient linéaire de saccharose (2,3 ml d'une solution à 20% et 2,3 ml d'une solution à 5%). Ce gradient est préparé dans un tampon contenant : HCHO , 1,1 M; Na_2HPO_4 , 0,09 M; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,01 M. Le mélange est centrifugé pendant 5 heures à 33.000 g max.; après centrifugation, on perfore le fond du tube et récolte des fractions de 0,2 ml, dont la densité optique est mesurée à 260 nm.

Les résultats de l'évaluation de l'homogénéité et de la pureté de l'ARN obtenu selon la méthode que nous venons de décrire sont consignés dans la Figure 8.

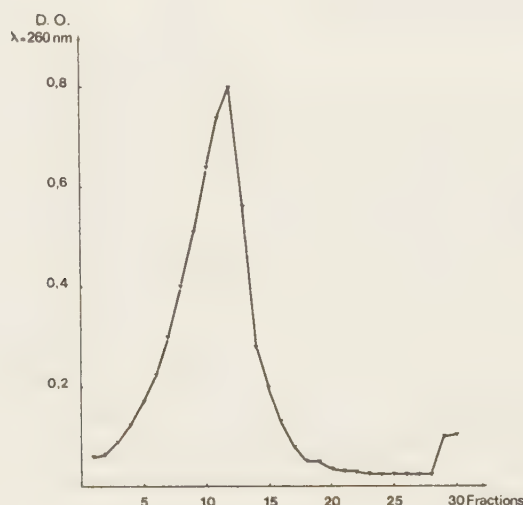


Fig. 8. Sédimentation de l'ARN du phage R17 après traitement à la formaldéhyde.

3.2.4 Synthèse de chaînes polypeptidiques 'in vitro'

Ces tests de synthèse 'in vitro' de polypeptides ont été réalisés dans des systèmes dirigés par deux types d'ARN messager, le poly U et l'ARN du phage R17. Souvent en effet, les tests utilisant un messager naturel offrent des résultats mieux reproductibles que ceux qui sont dirigés par le poly U (LUZZATTO et coll., 1968).

a) Synthèse dirigée par le messager poly U

Dans ce système le poly U utilisé comme messager dirige la synthèse de chaînes de polyphényl-alanine (NIRENBERG et MATTHAEI, 1961). Le système complet est décrit ci-après:

a) Solution 'mix' :

tampon Tris-HCl pH 7,4, 1 M	1 ml
solution d'ARNs à 50 mg/ml (s. RNA de <i>E. coli</i> B 60450, General Biochemicals U.S.A.)	0,5 ml
solution d'ATP, 0,05 M (adénosine-5'-triphosphate disodium, $4\text{H}_2\text{O}$; A grade, Calbiochem)	0,4 ml
solution de GTP, 0,02 M (guanosine-5'-triphosphate sodium, 2000, PL Biochemicals)	0,3 ml
phosphoénolpyruvate : 0,07 M (Boehringer und Sohne, 15179 SPAB)	1 ml

	MgCl ₂ , 0,1 M (magnesium chlorid, 6H ₂ O, Merck)	1,4 ml
	NH ₄ Cl, 4 M (ammonium chlorid, Merck)	0,5 ml
	H ₂ O	4,9 ml
	Le système complet contient 100 µl de cette solution.	
	On y ajoute :	
b)	pyruvate-kinase : 1 mg/ml (Boehringer Mannheim)	10 µl
c)	S100	40 µl
d)	ribosomes, suspension à 10 µg/ml (suspension des ribosomes extraits des différentes souches étudiées)	10 µl
e)	solution d'un mélange de 20 acides aminés non radioactifs à 1 µ mole/ml	10 µl
	Ce système est préincubé pendant 30 min à 37°C pour éliminer l'ARN endogène existant toujours dans les préparations ribosomiques. Les éléments suivants sont ensuite ajoutés :	
f)	messenger : solution de poly U à 4 mg/ml (polyuridylic acid, potassium salt, A grade, Calbiochem)	10 µl
g)	solution de phénylalanine-C ¹⁴ (L-3 phénylalanine-C ¹⁴ (U) 513 mCi/mmol, Radiochemical Centre, Amersham)	10 µl
	Cette solution est préalablement ajustée à 10 µCi et 1 µ mole/ml par une solution 10 ⁻² M de phénylalanine non radioactive (L-phénylalanine CHR, Fluka)	
h)	solution de sulfate de streptomycine à 2 mg/ml	10 µl

Dans ce système, la concentration finale en streptomycine est de 100 µg/ml. Les tubes de contrôle contiennent tous les éléments décrits ci-dessus à l'exception de la streptomycine. Le système final est incubé à 37°C pendant 30 min. On bloque la synthèse des chaînes polypeptidiques par l'adjonction de 2 ml d'une solution refroidie à + 4°C, contenant 5 % d'acide trichloracétique (TCA) et 3 % d'acides aminés (Bacto Vitamin-Free Casamino Acids, Difco). Les tubes sont portés à température d'ébullition (environ 90°C) pendant 15 min pour la solubilisation de l'ARNs et la dissolution du complexe ribosome-chaînes polypeptidiques. Après refroidissement, le contenu de chaque tube est filtré sur filtres GF/C (Glass Fibre Paper Whatman GF/C). Chaque filtre est lavé avec 6 ml de la solution de TCA - acides aminés, ce qui permet d'éliminer la phényl-alanine C¹⁴ non incorporée dans les chaînes polypeptidiques. Après séchage, on place chaque filtre dans 10 ml de liquide de scintillation (2,2'-phénylen-bis-(-5-phényloxazol), Merck; POPOP : 0,5 g; 2,5-diphényloxazol, Merck, PPO : 4 g dans 1 litre de toluène (Toluène, solution pour mesures de scintillation, Merck). Les échantillons sont soumis au comptage dans un Tri-Carb (Packard).

b) Synthèse dirigée par l'ARN du phage R17

Dans ce système, l'ARN du phage R17 agit comme ARN messenger et dirige la synthèse de chaînes polypeptidiques en présence d'acides aminés. Le déroulement des opérations est analogue à celui décrit dans le système précédent, hormis deux exceptions : la phényl-alanine-C¹⁴ est remplacée par un mélange de 16 acides aminés radioactifs (Amino-Acids C¹⁴ mixture, high specific activity, 54 mCi/ma, Radio Chemical Centre, Amersham); on y ajoute les 6 acides

aminés manquants sous forme non radioactive. La concentration finale en acides aminés est ajustée à 10 μ Ci et 1 μ mole/ml; l'ARN du phage R17, en solution contenant 6 mg/ml, remplace le poly U.

3.3 RESULTATS

Le Tableau VIII résume les résultats des tests de synthèse de chaînes polypeptidiques conduits, dans les deux systèmes dirigés par le messenger poly U et par l'ARN du phage R17 en présence des ribosomes de souches sensibles ou résistantes à la streptomycine.

Dans le système dirigé par le poly U, les ribosomes de la souche sensible de référence (MRE 600 str^S) accuse une forte sensibilité à l'action de l'antibiotique. La moyenne des résultats obtenus au cours de plusieurs expériences fait ressortir que, en présence de streptomycine, la diminution de la synthèse des chaînes polypeptidiques est de 70 % environ.

Tableau VIII

Synthèse des polypeptides 'in vitro'

Souches	% incorporation				% inhibition		Ribosomes
	poly U		ARN-R17		poly U	ARN-R17	
	- str	+ str	- str	+ str			
<u>E. coli</u> MRE 600 sensible	100	27	100	28	73	72	sensibles
<u>E. coli</u> K12-712 résistant locus A	100	100	100	100	0	0	résistants
salmonelles sauvages 6 souches résistantes locus A	100	90-100	-	-	0-10	-	résistants
salmonelles sauvages 3 souches résistantes locus B	100	30-50	-	-	50-70	-	sensibles
<u>E. coli</u> K12-703 (RT1) résistance plasmidique	100	30-35	100	35	65-75	65	sensibles

Légende : - str : système de synthèse de chaînes polypeptidiques sans streptomycine
+ str : système de synthèse de chaînes polypeptidiques avec streptomycine.

b) Pour les 3 autres souches, les ribosomes réagissent de manière identique à celle de la souche sensible de référence. La synthèse de chaînes polypeptidiques est fortement inhibée en présence de streptomycine. La capacité de liaison de cet antibiotique sur les ribosomes empêche le fonctionnement normal de ces derniers. Chez ces souches la résistance ne siège donc pas au niveau des ribosomes. On peut supposer que le contrôle génétique de cette résistance dépend d'une mutation localisée sur le locus B et s'exprime par une modification au niveau de la membrane cellulaire (YAMADA et DAVIES, 1971).

B) Les ribosomes des souches portant un déterminant plasmidique de résistance se comportent comme les ribosomes des souches sensibles. En présence de streptomycine, la synthèse de chaînes polypeptidiques, que le système soit dirigé par poly U ou par l'ARN du phage R17, est fortement inhibée.

C) Dans le système dirigé par l'ARN du phage R17, nous n'avons pas pu mettre en évidence une synthèse de chaînes polypeptidiques, lorsque nous utilisons les ribosomes extraits des souches sauvages de salmonelles chez lesquelles la résistance est due à une mutation chromosomique. La différence d'activité des ribosomes entre le système dirigé par le poly U et le système dirigé par le messenger naturel peut s'expliquer par la présence d'une ribonucléase endogène existant chez les souches sauvages. Il est évident que, dans ce cas, cette enzyme détruit le RNA du phage R17. Le poly U résiste mieux à l'action de cette enzyme parce que sa structure comprend des codons identiques; en cas de scission par l'enzyme, la synthèse continue avec des messagers plus courts. Par contre, la complexité de l'ARN formé par des codons différents le rend plus sensible à l'action de l'enzyme. Ces hypothèses ont été vérifiées par les tests de liaison de dihydrostreptomycine H^3 que nous présentons au chapitre suivant.

Chapitre 4

LIAISON DE LA DIHYDROSTREPTOMYCINE TRITIÉE
(DHSM-H³) AUX SOUS-UNITÉS RIBOSOMIQUES ET
INCORPORATION CELLULAIRE DE DHSM-H³

- 4.1 Introduction
- 4.2 Matériel et méthodes
 - 4.2.1 Souches bactériennes
 - 4.2.2 Préparation des ribosomes
 - 4.2.3 Séparation des sous-unités ribosomiques
 - 4.2.4 Tests de liaison de la DHSM-H³ sur les sous-unités ribosomiques
 - 4.2.5 Tests d'incorporation cellulaire de la DHSM-H³
- 4.3 Résultats
 - 4.3.1 Liaison de la DHSM-H³ sur les sous-unités ribosomiques
 - 4.3.2 Incorporation cellulaire de la DHSM-H³
- 4.4 Discussion et conclusions

4.1. INTRODUCTION

Dans leurs études sur la synthèse de chaînes polypeptidiques 'in vitro', FLAKS et coll. (1962), ainsi que SPEYER et coll. (1962) ont montré que, lorsque la résistance était due à une mutation sur le locus A, les ribosomes étaient seuls impliqués dans la sensibilité ou la résistance à la streptomycine. Par réassociation des sous-unités ribosomiques 30S et 50S isolées de souches sensibles et résistantes, COX et coll. (1964) ont prouvé que les réactions face à la streptomycine étaient uniquement déterminées par la source des sous-unités 30S.

En étudiant la formation de sous-unités 30S à partir de 'core particles' et de 'split particles', TRAUB et coll. (1966), TRAUB et NOMURA (1968a), ainsi que TRAUB et NOMURA (1966b) ont déterminé que cette résistance était fonction de la source des 'core particles'. La protéine dont la synthèse est contrôlée par le locus strA a été identifiée par OZAKI et coll. (1969) qui l'ont nommée protéine P10. Cette protéine est responsable de l'initiation de la synthèse de chaînes polypeptidiques (TRAUB, 1970; NOMURA, 1970).

Nous avons confirmé que, chez les salmonelles sensibles, la streptomycine agissait au niveau des ribosomes. De plus, nous avons démontré que les ribosomes des souches portant une mutation localisée sur le locus B, ainsi

que les ribosomes des souches portant un déterminant plasmidique se comportaient de manière identique à celle des ribosomes des souches sensibles. Il était donc important de démontrer la capacité de liaison de la dihydrostreptomycine tritiée sur les sous-unités ribosomiques de ces mêmes souches.

YAMADA et DAVIES (1971) ont émis l'hypothèse qu'une modification de certains caractères de perméabilité était responsable de la résistance à la streptomycine chez les salmonelles porteuses d'une mutation localisée sur le locus B. Leurs ribosomes sont en effet sensibles à l'action de la streptomycine dans un système de synthèse de chaînes polypeptidiques 'in vitro'. Si l'on accepte cette hypothèse, on peut admettre que, chez ces germes, la pénétration de l'antibiotique est inhibée par un mécanisme spécifique. De plus, nous avons établi que, chez les souches sauvages d'entérobactéries dont la résistance à la streptomycine était due à un gène extrachromosomique, il existait une discordance dans la mise en évidence d'une inactivation enzymatique; en effet si l'inactivation de la streptomycine est facilement démontrable en système acellulaire, il n'en est pas de même en système cellulaire. Cette discordance nous a suggéré qu'un autre mécanisme de résistance pourrait intervenir : l'inactivation de la streptomycine due à la présence de l'enzyme dans la cellule bactérienne. Les ribosomes de ces mêmes germes sont sensibles 'in vitro' à l'action de l'antibiotique. Dans ces phénomènes de résistance, un mécanisme responsable de certaines modifications au niveau de la membrane cellulaire pourrait être envisagé, mécanisme qui expliquerait la discordance que nous venons de décrire.

Pour mettre en évidence une inhibition de la pénétration de l'antibiotique, nous avons élaboré des tests d'incorporation cellulaire en recourant à la dihydrostreptomycine tritiée.

4.2. MATERIEL ET METHODES

4.2.1 Souches bactériennes

A) Souches utilisées pour la liaison de la DHSM-H³ sur les sous-unités ribosomiques

1. *E. coli* MRE 600 lac⁺ RNase_I⁻ str^S
2. *E. coli* K12-712 F⁻ lac⁻ pro⁻ his⁻ try⁻ str^r
3. RS 81 *S. brandenburg* str^r (locus B)
4. RS 161 *S. brandenburg* str^r (locus B)
5. RS 191 *S. panama* str^r (locus A)
6. *E. coli* K12-703 F⁻ (RT1) = *E. coli* K12 portant un déterminant plasmidique issu d'une souche sauvage de *S. typhimurium*.

B) Souches utilisées pour les tests d'incorporation cellulaire de la DHSM-H³

1. Souches de référence :
 - E. coli* K12-703 F⁻ str^S
 - E. coli* K12-712 F⁻ lac⁻ pro⁻ his⁻ try⁻ str^r (locus A) *
2. Souches à résistance plasmidique :
 - E. coli* K12-703 F⁻ (RS 168)
 - E. coli* K12-703 F⁻ (RS 27)
 - E. coli* K12-703 F⁻ (RS 301)
 - E. coli* K12-703 F⁻ (RS 133)
 - E. coli* K12-703 F⁻ (RT1)

Les souches de *E. coli* K12-703 ont reçu un déterminant de résistance transférable à la streptomycine issu des diverses souches sauvages de salmonelles.

3. Souches sauvages de salmonelles sensibles ou résistantes :

RS 303	<u>S. brandenburg</u>	<u>str</u> ^S
RS 81	"	<u>str</u> ^r (locus B) *
RS 114	"	<u>str</u> ^r (locus B) *
RS 177	"	<u>str</u> ^r (locus A) *
RS 148	<u>S. enteritidis</u>	<u>str</u> ^S
RS 161	"	<u>str</u> ^r (locus B) *
RS 401	<u>S. panama</u>	<u>str</u> ^S
RS 191	"	<u>str</u> ^r (locus A) *

* Ce caractère a été déterminé par les tests de synthèse de chaînes polypeptidiques.

4. Souche sauvage de salmonelle avec variant sensible :

RT1	<u>S. typhimurium</u>	<u>str</u> ^r
		(résistance plasmidique)
RT1(sens.)	<u>S. typhimurium</u>	<u>str</u> ^S
		(variant sensible)

4.2.2 Préparation des ribosomes

La technique utilisée pour la préparation des ribosomes est celle que nous avons décrite au chapitre 3.

4.2.3 Séparation des sous-unités ribosomiques

Les sous-unités 30S et 50S ont été séparées sur un gradient de saccharose selon la méthode suivante.

Des solutions de saccharose à 5 et 20 % (saccharose pour centrifugation en gradient de densité, dépourvu de RNase) sont préparées en tampon TMK 50/30. 15 ml de chacune des solutions sont utilisés pour la formation d'un gradient linéaire. Les tubes de gradient formés sont placés 3 heures à +4°C avant l'emploi. Sur ces gradients, on dépose avec précaution 1 ml d'une suspension de ribosomes préparés en condition 50S/30S (12 mg/ml). On centrifuge 12 heures à 58.000 g max. Après la perforation du fond des tubes, on récolte 31 fractions de 1 ml. Toutes les opérations se font à +4°C. 100 µl de chaque fraction sont dilués dans 500 µl d'eau et la densité optique est lue à 260 nm. Simultanément, on prélève 100 µl de chaque fraction pour les tests de liaison.

La pureté des sous-unités 30S et 50S est contrôlée par deux méthodes :

- a) par électrophorèse sur gels de polyacrylamide à 7,5 % en présence d'urée 8 M, pH 4,8 (TRAUT et coll., 1969);
- b) par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 10 %, en présence de 0,1 % SDS selon TRAUT et coll. (1969).

4.2.4 Tests de liaison de la DHSM-H³ sur les sous-unités ribosomiques

La capacité de liaison de la DHSM-H³ a été étudiée selon la méthode de KAJI et TANAKA (1968) avec les fractions obtenues après centrifugation sur gradient de saccharose. On prélève 100 µl de chaque fraction auxquels on ajoute 40 µl d'une solution de poly U à 2 mg/ml en tampon Tris-HCl, 0,08 M; (CH₃COO)₂ Mg, 0,06 M et KCl, 0,03 M; pH 7,8. On introduit 10 µl d'une solution de DHSM-H³ contenant 20 µCi/ml (dihydrostreptomycine-H³ sesquisulfate 3 Ci/mmele, Radio Chemical Centre, Amersham). Ces préparations sont incubées 30 min à 37°C, avec agitation, puis la réaction est arrêtée par adjonction de 3 ml de tampon Tris-HCl, 0,1 M; KCl, 0,05 M; (CH₃COO)₂ Mg,

0,02 M; pH 7,8,préalablement refroidi. Les préparations sont filtrées sur filtre Millipore de porosité 0,45 μm ; chaque filtre est lavé avec 6 ml du tampon décrit ci-dessus, puis séché. Le lavage a pour but d'éliminer la DHSM- H^3 non liée. Les filtres sont alors placés dans 10 ml de liquide de scintillation et comptés dans un Tri-Carb (Packard).

4.2.5 Tests d'incorporation cellulaire de la DHSM- H^3

Les cellules bactériennes sont cultivées dans un bouillon nutritif pendant 18 heures. 1 ml de la culture est inoculé dans 50 ml de bouillon stock, incubé à 37°C sous agitation. On arrête la croissance en phase exponentielle par centrifugation à 4°C pendant 10 min à 13.000 g. Les culots sont lavés en milieu PG (1 % protéose-peptone (Difco); 0,1 % glucose; pH 7,6), puis suspendus dans 10 ml de ce milieu. Le milieu PG a été utilisé d'après l'observation de PERRY (1969).

Pour éviter une trop grande disparité entre les différentes souches, on ajuste le nombre de cellules dans chaque échantillon. Les suspensions les plus concentrées sont diluées avec du PG de façon à obtenir une densité optique identique à celle de la suspension la plus pauvre en germes. A 9 ml de chacune des suspensions, on ajoute 1 ml d'une solution contenant 50 $\mu\text{g/ml}$ de dihydrostreptomycine non radioactive et 1 $\mu\text{Ci/ml}$ de DHSM- H^3 .

Au temps 0, 30', 60', 120' et 180', on prélève :

- a) 1 ml de chaque échantillon dans lequel, après filtration, on détermine le taux d'incorporation cellulaire de DHSM- H^3 et
- b) 0,2 ml pour la numération des cellules vivantes.

Les prélèvements a) sont filtrés sur filtre Millipore de porosité 0,45 μm . On lave ensuite avec 12 ml de milieu PG contenant 10 $\mu\text{g/ml}$ de dihydrostreptomycine non radioactive. Ces lavages permettent non seulement d'éliminer la DHSM- H^3 libre, mais également celle qui pourrait être liée à des sites non spécifiques de la membrane cellulaire. Les filtres sont alors séchés, puis placés dans 10 ml de liquide de scintillation. La radioactivité due à la dihydrostreptomycine fixée sur les cellules dans chaque échantillon est comptée dans un Tri-Carb (Packard).

4.3. RESULTATS

4.3.1 Liaison de la DHSM- H^3 sur les sous-unités ribosomiques

La souche de E. coli MRE 600 a été choisie comme souche de référence. Elle porte des ribosomes sensibles à l'action de la streptomycine, et l'on peut supposer que la liaison de l'antibiotique se fait normalement sur les sous-unités 30S (NOMURA, 1970). Pour que cette réaction se produise, il est indispensable que les préparations contiennent l'ensemble des protéines qui constituent normalement ces sous-unités. Les contrôles des sous-unités ribosomiques ont été faits par électrophorèse sur gels de polyacrylamide.

Les gels de polyacrylamide, soit à pH acide en présence d'urée, soit en présence de SDS, ont révélé que les préparations de 50S et de 30S contenaient la totalité des protéines spécifiques de chaque sous-unité. La Figure 9 montre la composition en protéines des sous-unités ribosomiques, l'identification étant assurée par comparaison avec les résultats obtenus par TRAUT et coll. (1969).

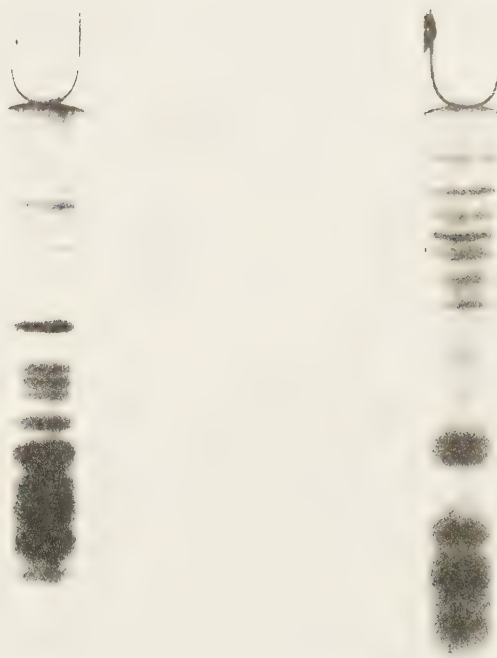


Fig. 9. Gels de polyacrylamide (SDS 0,1 %) : identification des protéines des sous-unités 50S (à gauche) et 30S (à droite) de la souche MRE 600 str^S.

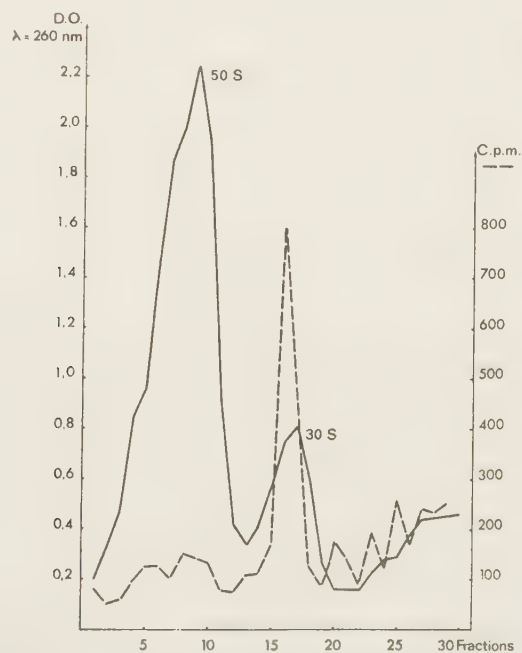


Fig. 10. Liaison de la DHSM- H^3 sur les sous-unités ribosomiques de la souche MRE 600 str^S

———— densité optique à 260 nm

----- coups par min (liaison DHSM- H^3).

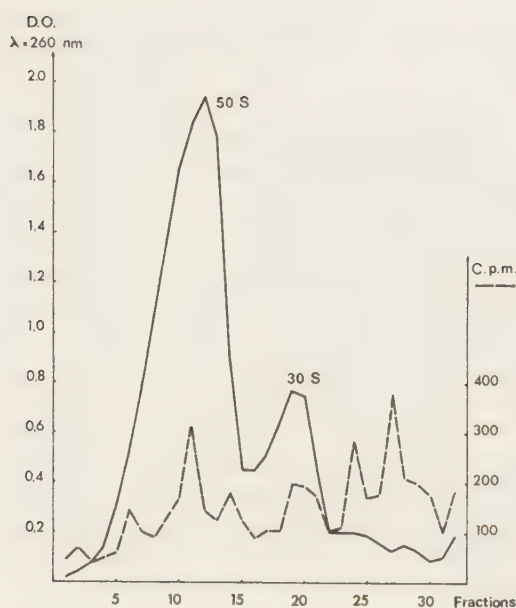


Fig. 11. Liaison de la DHSM-H³ sur les sous-unités ribosomiques de la souche *E. coli* K12-712 str^r (locus A).

Dans la Figure 10, la DHSM-H³ se lie spécifiquement sur les sous-unités 30S de la souche MRE 600 str^s. La Figure 11 illustre les essais effectués avec des ribosomes extraits d'une souche de *E. coli* K12-712 lac⁻ pro⁻ his⁻ try⁻ F⁻ str^r (locus A). On ne peut déceler aucun pic de radioactivité avec les sous-unités ribosomiques de cette souche. Ce fait confirme que la résistance de la souche est bien due à une modification au niveau des ribosomes, vraisemblablement au niveau de la sous-unité 30S. Nous observons parfois une liaison de la DHSM-H³ sur des sites non spécifiques, phénomène explicable par un début d'aggrégation de certaines protéines ribosomiques. Il est intéressant de préciser que la présence de poly U dans notre système est indispensable à la liaison de l'antibiotique sur les sous-unités 30S.

Nos résultats concordent avec les observations de DAVIES et coll. (1965), puis avec ceux de KAJI et TANAKA (1968). Nous n'avons pas pu déceler une liaison de DHSM-H³ en absence de poly U, en contradiction cette fois avec les résultats de CHANG et coll. (1972).

Les souches sauvages de salmonelles porteuses d'une mutation sur le locus B possèdent des ribosomes sensibles à l'action de la streptomycine dans les systèmes de synthèses de chaînes polypeptidiques 'in vitro'; il en est de même pour les souches dont la résistance est contrôlée par un gène localisé sur un élément extra-chromosomique. Toutes les souches portant une mutation sur le locus B ou dont la résistance est due à un facteur R se comportent comme la souche de référence de *E. coli* MRE 600 str^s; les profils de radioactivité se superposent au profil que nous avons présenté dans la Figure 10. La souche de *S. panama* (RS 191) portant une mutation sur le locus A se comporte comme la souche de référence de *E. coli* K12-712 str^r (Figure 11).

Ainsi, nos essais de liaison de DHSM-H³ sur les sous-unités ribosomiques confirment les résultats que nous avons obtenus précédemment (cf. Synthèse de chaînes polypeptidiques 'in vitro', chapitre 3).

4.3.2 Incorporation cellulaire de la DHSM-H³

Pour étudier le comportement des souches sensibles et résistantes à la streptomycine dans un système cellulaire en présence de l'antibiotique, nous avons effectué des tests d'incorporation cellulaire avec la DHSM-H³. A cet effet, nous avons choisi différentes souches sensibles : *E. coli* K12-703F⁻, variant sensible de *S. typhimurium* (RT1), *S. panama* (RS 191), *S. brandenburg* (RS 303), *S. enteritidis* (RS 148), ainsi qu'un lot de souches résistantes, souches portant une mutation sur le locus A : *S. panama* (RS 191), *S. brandenburg* (RS 177), et souches portant une mutation sur le locus B : *S. brandenburg* (RS 81) et (RS 114), *S. enteritidis* (RS 161) et finalement des souches porteuses d'un déterminant plasmidique: RT1 ; K12-703F⁻ (RS 168); K12-703F⁻ (RS 27), K12-703F⁻ (RS 301), K12-703F⁻ (RS 133) et K12-703F⁻ (RT1).

Les Figures 12 et 13 expriment les résultats obtenus avec un certain nombre de souches étudiées; il s'agit du taux de fixation de DHSM-H³ en fonction du temps. Le nombre de coups par min (cpm) y est exprimé par unité cellulaire vivante.

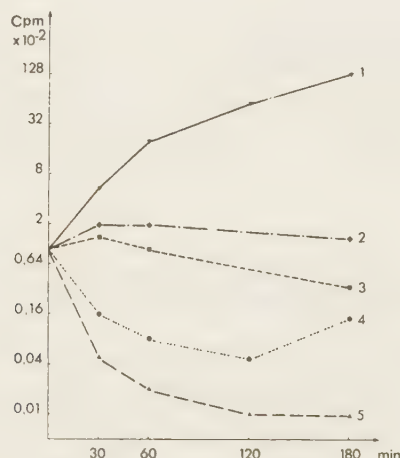


Fig. 12. Taux d'incorporation cellulaire de DHSM-H³ par unité cellulaire vivante en fonction du temps

1. *S. typhimurium* sensible
2. *S. typhimurium* avec résistance plasmidique
3. *S. brandenburg*, résistant, locus A
4. *S. brandenburg*, résistant, locus B
5. *E. coli* K12-712, F⁻ lac⁻ pro⁻ his⁻ try⁻, str^r (locus A).

Chez les souches sensibles à la streptomycine (*E. coli* K12-703F⁻, variant sensible de *S. typhimurium* RT1 (str^S); *S. panama* str^S (RS 401); *S. brandenburg* str^S (RS 303) et *S. enteritidis* str^S (RS 148)), on constate que l'incorporation de dihydrostreptomycine augmente significativement en fonction du temps, le nombre de cpm passant de 0,6 à plus de 128 x 10⁻² cpm par cellule vivante.

Toutes les souches résistantes, que leur résistance soit due à une mutation chromosomique ou qu'elle soit due à un gène extrachromosomique, se comportent de manière identique. L'incorporation cellulaire est fortement abaissée en fonction du temps. On n'observe pas de différence entre les souches sauvages portant une mutation sur le locus A (*S. panama* RS 191 et *S. brandenburg* RS 177), les souches portant une mutation sur le locus B (*S. brandenburg* RS 81,

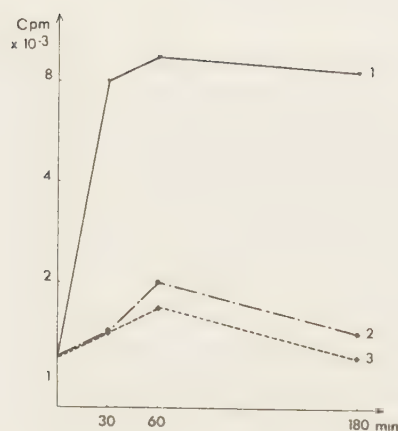


Fig. 13. Taux d'incorporation cellulaire du DHSM-H³ par unité cellulaire vivante en fonction du temps

1. *E. coli* K12-703 : type sauvage F⁻, sensible
2. *E. coli* K12-703 (RT1) avec résistance plasmidique
3. *E. coli* K12-703 (RS 168) avec résistance plasmidique.

RS 114, et *S. enteritidis* RS 161) et les souches portant un déterminant plasmidique : RT1; (K12-703F⁻(RS 168); K12-703F⁻ (RS 27); K12-703F⁻ (RS 301); K12-703F⁻ (RS 133) et K12-703F⁻ (RT1)). Avec la souche *E. coli* K12-712 porteuse d'une mutation localisée sur le locus A, le profil de radioactivité est dans tous les cas superposable.

4. 4. DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Chez les mutants chromosomiques de salmonelles sauvages portant une mutation sur le site A, l'incapacité de lier la DHSM-H³ sur leurs sous-unités ribosomiques confirme les résultats que nous avons obtenus avec les tests de synthèse de chaînes polypeptidiques : il y a résistance au niveau des ribosomes.

Quant aux mutants chromosomiques de salmonelles portant une mutation sur le site B, la sensibilité de leurs ribosomes à l'action de la streptomycine dans un système de synthèse de chaînes polypeptidiques se trouve confirmée : la capacité de liaison entre l'antibiotique et les ribosomes est considérable.

Nous avons vu précédemment que les ribosomes des souches de *E. coli* et de salmonelles portant un déterminant plasmidique montraient une forte sensibilité à l'action de la streptomycine dans un système de synthèse de chaînes polypeptidiques; une même sensibilité est également démontrée par la forte capacité de liaison que possède l'antibiotique pour les sous-unités 30S.

Les souches sensibles de *E. coli* et salmonelles que nous avons utilisées comme contrôles (Figure 10) possèdent des ribosomes sensibles; elles accusent également un fort pouvoir de liaison pour la DHSM-H³ au niveau de leurs sous-unités 30S.

Les tests d'incorporation cellulaire avec la DHSM-H³ chez les espèces, souches et variantes de *E. coli* ou de salmonelles que nous avons étudiées, ont démontré que toutes les souches résistantes se comportaient de manière identique : l'incorporation cellulaire de la DHSM-H³ est fortement inhibée, alors que cette incorporation augmente de façon significative chez les souches sen-

sibles (Figures 12 et 13).

Face à ces résultats, voici l'interprétation que nous sommes amenée à proposer. La forte accumulation de DHSM- H^3 chez les souches sensibles est imputable à la capacité de fixation de l'antibiotique sur les ribosomes. Chez les souches portant une mutation sur le site A, le défaut d'accumulation de la DHSM- H^3 doit s'expliquer par une inhibition de fixation de l'antibiotique au niveau des ribosomes. Par contre, pour les souches porteuses d'une mutation chromosomique sur le site B et possédant des ribosomes sensibles, il convient d'invoquer un phénomène de perméabilité.

- Les souches porteuses d'un déterminant plasmidique
- élaborent une enzyme inactivatrice de la streptomycine,
 - possèdent des ribosomes sensibles à l'action de la streptomycine dans le système de synthèse de polypeptides 'in vitro',
 - ont un taux d'incorporation cellulaire de DHSM- H^3 fortement abaissé.

Ces constatations nous paraissent en mesure d'élucider certains points restés encore obscurs, tels que la discordance qui existe dans les mécanismes d'inactivation 'in vivo' et 'in vitro', puis les hauts niveaux de résistance conférés par la production d'une faible quantité d'enzyme.

Si l'on admet que les dérivés inactivés par voie enzymatique ne sont plus capables d'introduire des fautes de lecture au niveau des ribosomes, on peut supposer qu'ils exercent une rétroinhibition sur le système de transport de l'antibiotique soit à travers la membrane cellulaire, soit dans le cytoplasme bactérien. Ils pourraient aussi bloquer les récepteurs de l'antibiotique sur les couches périphériques de la membrane cellulaire ou intervenir dans les équilibres osmotiques : leur présence intracellulaire empêcherait alors, par des mécanismes physico-chimiques, la pénétration de streptomycine active à l'intérieur de la cellule.

Ainsi les derniers résultats que nous avons obtenus, résumés dans le Tableau IX, permettent de différencier avec plus de précision les modes de résistance à la streptomycine qui existent chez les entérobactéries.

Tableau IX

Tableau récapitulatif des propriétés de *E. coli* et de salmonelles selon leur mode de résistance

	Souches sensibles	Souches résistantes		
		résistance plasmidique	résist. chromosomique locus A	locus B
Inactivation de la streptomycine	-	+	-	-
Activité de la streptomycine sur la synthèse des protéines 'in vitro'	+	+	-	+
Liaison de la DHSM- H^3 sur les sous-unités ribosomiques 30S	+	+	-	+
Incorporation cellulaire de DHSM- H^3	+	-	-	-

Chapitre 5

DISCUSSION FINALE ET CONCLUSIONS

Les résultats obtenus dans ce travail permettent de mettre en évidence un certain nombre de propriétés qui caractérisent les divers modes de résistance à la streptomycine chez les entérobactéries. Nos expériences ont porté essentiellement sur l'étude des genres *SALMONELLA* et *ESCHERICHIA*. L'introduction de souches sauvages dans nos expériences fut à l'origine de plusieurs informations nouvelles qu'il aurait été difficile d'obtenir par l'étude des seules souches de laboratoire. L'ensemble de nos résultats suggèrent que quatre réactions au moins peuvent se manifester dans le comportement des entérobactéries face à la streptomycine. Dans la description de ces quatre réactions, nous n'avons pas envisagé la streptomycine-dépendance (LUZZATO et coll., 1968b et MOMOSE et GORINI, 1971), puisque ce mécanisme n'a, pour l'instant, été démontré que chez certaines souches de laboratoire (*E. coli* K12 et *S. typhimurium* LT-2). les souches que nous avons étudiées peuvent être classées dans l'un des trois groupes suivants :

- groupe 1 : souches sensibles à la streptomycine,
- groupe 2 : souches résistantes à la streptomycine, porteuses d'une mutation chromosomique. Dans ce groupe, on distingue deux sous-groupes selon que leur mutation est localisée sur le locus A ou sur le locus B,
- groupe 3 : souches porteuses d'un déterminant plasmidique de résistance.

Ad groupe 1. Les souches sensibles à l'antibiotique qui forment ce groupe ont certains caractères particuliers. Il n'est pas possible de mettre en évidence chez elles une enzyme inactivatrice de la streptomycine dans un système acellulaire. Les expériences de synthèse de chaînes polypeptidiques 'in vitro' ont montré que c'était les ribosomes de ces souches qui étaient sensibles à l'action de la streptomycine. L'inhibition de la synthèse de polypeptides est de l'ordre de 70 % pour la souche de référence (*E. coli* MRE 600, souche de laboratoire, *str*^S). Ce degré d'inhibition se manifeste soit que l'on utilise comme messager un RNA synthétique de type poly U, soit que l'on recoure à un messager naturel tel que le RNA extrait du phage R17 (Tableau VIII). Ces observations sont corroborées par le fait que, chez les souches sensibles, l'antibiotique se lie spécifiquement sur un site localisé dans la sous-unité 30S des ribosomes (Figure 10); elles se recouvrent avec les conclusions de FLAKS et coll. (1962) et de COX et coll. (1964).

L'incorporation élevée de dihydrostreptomycine tritiée chez les bactéries sensibles, telle qu'elle est démontrée par nos expériences avec des systèmes cellulaires (Figures 12 et 13) s'explique par la forte affinité de l'antibiotique pour les ribosomes des souches de ce groupe. Aussi est-il normal que les souches sensibles soient capables de réaliser une forte accumulation de l'antibiotique avant même que l'effet bactéricide de ce dernier ait eu le temps de se manifester.

Ad groupe 2. Le deuxième groupe représente les populations bactériennes résistantes, mais chez lesquelles il n'a pas été possible de procéder à un transfert du gène de résistance. Il s'agit ici d'une résistance due à une mutation chromosomique. Cette présomption trouve sa confirmation dans le fait qu'ici on ne peut pas mettre en évidence l'intervention d'un mécanisme d'inactivation de la streptomycine (DAVIES et ROWND, 1972). Dans leurs expériences de caractère purement génétique, TAYLOR et TROTTER (1967) ont montré que, chez *E. coli*, la résistance à contrôle chromosomique était due à une mutation sur le locus A, qui entraîne une modification au niveau des ribosomes. Chez les salmonelles, la résistance à l'antibiotique peut résulter de deux mutations (SANDERSON et DEMEREC, 1965; SANDERSON, 1967). L'une des mutations est en rapport avec le locus A; elle est identique à celle que l'on trouve chez *E. coli*. L'autre est subordonnée au locus B. Dans ce dernier cas, la résistance n'est pas due à une modification au niveau des ribosomes; elle semble être plutôt consécutive à des altérations de la perméabilité cellulaire, caractère qui n'avait d'ailleurs pas été confirmé de façon péremptoire.

Nous nous sommes donc intéressée plus particulièrement à des souches sauvages de salmonelles, chez lesquelles aucun mécanisme d'inactivation enzymatique ne pouvait être mis en évidence. Partant de l'hypothèse que les souches possédant des ribosomes résistants à la streptomycine devaient leur résistance à une mutation sur le locus A et que les souches possédant des ribosomes sensibles (dépourvus d'enzyme inactivatrice) devaient leur résistance à une mutation sur le locus B, nous avons distingué deux sous-groupes de souches sauvages de salmonelles.

Le premier sous-groupe est constitué par les souches qui possèdent des ribosomes résistants à l'action de la streptomycine dans un système de synthèse de chaînes polypeptidiques 'in vitro' (Tableau VIII), qui réagissent donc comme des mutants obtenus en laboratoire portant une mutation sur le locus A. Le fait que leur résistance se situe au niveau des ribosomes a été confirmé par nos expériences; en effet, chez ces souches sauvages il n'est pas possible de démontrer une liaison spécifique de DHSM- H^3 sur leurs sous-unités ribosomiques (Figure 11). Compte tenu de ces résultats, il n'est pas surprenant que ces souches soient incapables d'incorporer l'antibiotique dans des systèmes cellulaires, puisqu'elles ne possèdent probablement aucun site de fixation suffisamment spécifique qui permette de déceler un taux intracellulaire significatif. Une modification dans la structure d'une des protéines de la sous-unité 30S empêche la liaison de l'antibiotique sur son site spécifique.

Le deuxième sous-groupe renferme des souches dont la résistance est due à une mutation chromosomique, mais qui possèdent des ribosomes sensibles à l'action de la streptomycine dans un système de synthèse de chaînes polypeptidiques 'in vitro' (Tableau VIII). Ces souches sont également, bien entendu, dépourvues d'enzyme inactivatrice. La sensibilité de leurs ribosomes a été confirmée par le fait que la DHSM- H^3 se lie sur les sous-unités 30S à un niveau au moins équivalent à celui que nous avons obtenu avec des ribosomes extraits de souches de référence sensibles à la streptomycine. Les expériences que nous avons mises au point pour étudier l'incorporation de l'antibiotique en système cellulaire suggèrent cependant que c'est bien au niveau de la perméabilité de la cellule que se manifeste le mécanisme de résistance à la

streptomycine. Il est très vraisemblable que la membrane bactérienne intervienne dans cette inhibition de l'accumulation intracellulaire de l'antibiotique. Selon notre hypothèse initiale, nous pouvons supposer que, chez ces souches, la résistance à la streptomycine est contrôlée par une mutation chromosomique localisée sur le locus B.

Ad groupe 3. Le troisième groupe de souches résistantes à la streptomycine est constitué par des cellules portant un déterminant plasmidique. La majorité des salmonelles et des *E. coli* que nous avons étudiées offraient une résistance transférable avec une fréquence très élevée. Cette propriété est une caractéristique des résistances plasmidiques (Tableaux IV et V). Si quelques-unes parmi ces souches ne sont pas capables de transférer leur caractère de résistance, elles mettent néanmoins en évidence un mécanisme d'inactivation enzymatique. Il est donc vraisemblable que ces souches portent un déterminant extrachromosomique codant pour la synthèse d'une enzyme; il est aussi vraisemblable qu'aucun facteur de transfert ne soit présent dans ce type de cellules, caractère parfaitement compatible avec la théorie d'ANDERSON (1968) sur les réplicons indépendants dans la structure de certains facteurs R.

Toutes les souches de *E. coli* et 60% des souches sauvages de salmonelles étudiées résistantes à la streptomycine sont capables d'élaborer au moins une enzyme inactivatrice de la streptomycine. Le mécanisme de l'inactivation n'est pas décelable en système cellulaire, mais il peut être démontré en système acellulaire. En effet, nous avons mis en évidence une inactivation avec les protéines obtenues soit par choc osmotique, soit par trituration à l'alumine. Il est intéressant de relever que chez quelques rares représentants de *E. coli*, la présence de l'enzyme ne peut être démontrée qu'après traitement avec un agent mutagène, rayons ultraviolets par exemple (Tableau IV).

L'activité enzymatique décelée dans les préparations obtenues après choc osmotique classe l'enzyme parmi les enzymes périplasmiques (NEU, 1968). Nous avons pu, pour trois différentes souches d'entérobactéries, déterminer quelques-unes des propriétés qui caractérisent cette enzyme inactivatrice, sans chercher à différencier entre une activité d'adénylation ou une activité de phosphorylation (UMEZAWA et coll., 1967; UMEZAWA et coll., 1968; OZANNE et coll., 1969). Nous avons cependant démontré la spécificité du substrat; en effet, parmi les aminoglycosides que nous avons étudiés (kanamycine, néomycine, gentamycine, dihydrostreptomycine et streptomycine), seules la dihydrostreptomycine et la streptomycine sont inactivées par l'enzyme.

La similitude des enzymes rencontrées chez les différentes souches étudiées est confirmée par un certain nombre de propriétés physico-chimiques. Ainsi, le poids moléculaire déterminé par filtration sur gel de Séphadex se situe aux environs de 31.000, valeur compatible avec les résultats qu'ont obtenus, par ultracentrifugation, BENVENISTE et coll. (1970). Les propriétés d'élution, après chromatographie sur diéthyl-amino-éthyl-cellulose, apportent un argument supplémentaire à l'identité de ces enzymes. Un autre caractère de similitude est celui fourni par la détermination du point isoélectrique après électrofocalisation sur gradient de pH.

L'impossibilité de provoquer chez l'animal la synthèse d'anticorps agglutinants spécifiques, même en utilisant comme antigènes des préparations par-

tiellement purifiées nous incite à formuler certaines hypothèses sur la structure et les propriétés de cette protéine. L'enzyme native pourrait être constituée par des sous-unités protéiniques et les diverses manipulations de purification aboutiraient à une dégradation de la molécule, entraînant la disparition des propriétés immunogènes. Il est cependant plus loisible de supposer que l'animal ne reconnaît pas l'enzyme comme protéine étrangère. En effet, les enzymes ATP dépendantes sont ubiquitaires et, de plus, la similitude structurelle de ces enzymes expliquerait l'absence de réactivité des animaux de laboratoire à l'administration de telles préparations protéiniques.

Chez les souches de *E. coli* K12 qui portent un déterminant plasmidique isolé d'une souche sauvage résistante à la streptomycine, les ribosomes sont sensibles à l'action de l'antibiotique dans un système de synthèse de chaînes polypeptidiques 'in vitro' (Tableau VIII). Une telle sensibilité se voit confirmée par la capacité de liaison de l'antibiotique sur les sous-unités 30S extraites de ces souches

La discordance qui existe dans la mise en évidence d'une enzyme inactivatrice selon que l'on s'adresse à un système cellulaire ou acellulaire, ainsi que la présence de ribosomes sensibles à l'action de la streptomycine dans un système de chaînes polypeptidiques 'in vitro' font suspecter l'existence d'un mécanisme supplémentaire entrant en action à la suite de l'inactivation de l'antibiotique. La très forte inhibition de l'incorporation cellulaire de la DHSM- H^3 chez les souches portant un déterminant extrachromosomique renforce la probabilité de l'existence d'un tel mécanisme (Figure 13). Des résultats analogues ont été obtenus aussi bien avec des souches sauvages de *E. coli* et de salmonelles qu'avec des souches de laboratoire chez lesquelles avaient été transférés divers déterminants de résistance provenant de ces souches sauvages. Il n'est toutefois pas encore possible de conclure de façon définitive sur le mécanisme exact de cette réaction.

L'enzyme ayant une localisation périplasmique, nous pensons pouvoir situer la réaction enzymatique dans les couches périphériques de la cellule bactérienne. On peut alors supposer que des dérivés inactivés issus de la réaction enzymatique altèrent certains caractères de la perméabilité cellulaire, créant ainsi une inhibition de la pénétration de l'antibiotique. Il pourrait s'agir du blocage d'un 'récepteur' de l'antibiotique par des dérivés inactifs, ou bien ces mêmes dérivés, par leur présence intracellulaire et grâce à un mécanisme physico-chimique, inhiberaient la pénétration de la streptomycine dans la cellule.

RESUME

Déterminée par des tests d'inactivation en système acellulaire et par les caractères de transférabilité, la localisation des gènes de résistance à la streptomycine peut être soit plasmidique, soit chromosomique. Chez toutes les souches sauvages de *E. coli* et 60 % des salmonelles étudiées, la résistance est due à une inactivation enzymatique à contrôle plasmidique. Chez 40 % des salmonelles, cependant, la résistance est due à une mutation chromosomique.

Quelle que soit la souche dont elle est issue, l'enzyme responsable de l'inactivation de la streptomycine présente plusieurs caractères communs : la localisation périplasmique, le poids moléculaire (31.000), la force ionique d'élution sur DEAE-cellulose, le point isoélectrique (4,78), ainsi que l'absence de pouvoir immunogène.

Dans les tests d'incorporation cellulaire de l'antibiotique (sous forme de dihydrostreptomycine tritiée, DHSM-H³) toutes les souches résistantes, qu'elles portent un déterminant plasmidique ou une mutation chromosomique, se comportent de manière identique. L'incorporation de DHSM-H³ est fortement abaissée chez les souches résistantes.

L'activité de la streptomycine sur la synthèse des protéines 'in vitro', en présence de ribosomes obtenus à partir de souches résistantes, permet de différencier les mécanismes de cette résistance. La synthèse de chaînes polypeptidiques, dirigée par poly U ou par du RNA du phage R17 en présence de ribosomes provenant de souches résistantes portant une mutation chromosomique, montre qu'il existe deux sites de contrôle pour cette résistance : chez certaines souches, l'activité de la streptomycine est nulle, ce qui permet de conclure que, chez ces souches, la résistance est située au niveau des ribosomes (locus A); la résistance de ces ribosomes a été confirmée par l'incapacité pour l'antibiotique de se fixer sur les sous-unités ribosomiques 30S. Chez les autres souches, la streptomycine exerce une forte activité inhibitrice sur la synthèse protéique. L'inhibition de l'incorporation cellulaire de dihydrostreptomycine tritiée, l'activité de l'antibiotique sur les ribosomes, ainsi que l'absence de toute enzyme inactivatrice montrent que chez ces souches, la résistance n'est due qu'à une modification de perméabilité (locus B). Chez ces souches, la sensibilité des ribosomes a été confirmée par la capacité de liaison de la streptomycine sur les sous-unités ribosomiques 30S.

Les mêmes tests, effectués en présence de ribosomes provenant de souches à résistance plasmidique, ont montré que la synthèse de chaînes polypeptidiques est inhibée par la streptomycine. Trois caractères peuvent ainsi être déterminés chez ces souches; la sensibilité des ribosomes, la capacité d'inactivation enzymatique dans un système acellulaire et l'inhibition de l'incorporation de dihydrostreptomycine tritiée en système cellulaire. Ces résultats prouvent que, chez les souches à résistance plasmidique, le mécanisme de résistance consiste en une inactivation enzymatique de la streptomycine, suivie d'une modification de certains caractères de perméabilité.

BIBLIOGRAPHIE

1. AHMAD-ZADEH, C.; FIGUET, J. D. and COLLI, L.: Molecular weight estimation of immunoglobulin subunits on polyacrylamide gel. *Immunology* **21** : 1065-1071 (1971).
2. AKIBA, T.: Mechanism of development of resistance in *Shigella*. Proc. 15th Gen. Meeting of the Japan. Med. Assoc. **5** : 299-305 (1959); quoted by WATANABE (1963).
3. ANDERSON, E. S.: A rapid screening test for transfer factors in drug-sensitive *Enterobacteriaceae*. *Nature (Lond.)* **208** : 1016-1017 (1965).
4. ANDERSON, E. S.: The ecology of transferable drug-resistance in the *Enterobacteria*. *Ann. Rev. Microbiol.* **22** : 131-180 (1968).
5. ANDERSON, E. S.; KELEMEN, M. V.; JONES, C. M. and PITTON, J. S.: Study of the association of resistance to two drugs in a transferable determinant in *Salmonella typhimurium*. *Genet. Res.* **11** : 119-124 (1968).
6. ANDERSON, E. S. and LEWIS, M. J.: Characterization of a transfer factor associated with drug resistance in *Salmonella typhimurium*. *Nature (Lond.)* **208** : 843-849 (1965).
7. ANDREWS, P.: Estimation of the molecular weight of proteins by Sephadex gel-filtration. *Biochem. J.* **91** : 222-233 (1964).
8. ANDREWS, P.: The gel-filtration behaviour of proteins related to their molecular weights over a wide range. *Biochem. J.* **99** : 595-606 (1965).
9. BENVENISTE, R.; YAMADA, T. and DAVIES, J.: Enzymatic adenylation of streptomycin and spectinomycin by R-factor-resistant *Escherichia coli*. *Infect. Immunity* **1** : 109-119 (1970).
10. BOEDTKER, H.: Dependence of the sedimentation coefficient on molecular weight of RNA after reaction with formaldehyde. *J. molec. Biol.* **35** : 61-70 (1968).
11. BOUANCHAUD, P.; SCAVIZZI, M. R. and CHABBERT, Y. A.: Elimination by ethidium bromide of antibiotic resistance in *Enterobacteria* and *Staphylococci*. *J. gen. Microbiol.* **54** : 417-425 (1968).
12. CAPECCHI, M. R.: Cell-free protein synthesis programmed with R17 RNA : identification of two phage proteins. *J. molec. Biol.* **21** : 173-193 (1966).
13. CHANG, F. N. and FLAKS, J. G.: Binding of dihydrostreptomycin to *Escherichia coli* ribosomes : Characteristics and equilibrium of the reaction. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2** : 294-307 (1972).
14. COX, E. C.; WHITE, J. R. and FLAKS, J. G.: Streptomycin action on the ribosome. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **51** : 703-709 (1964).
15. GINOZA, H. S. and PAINTER, R. B.: Genetic recombination between the resistance transfer factor and the chromosome of *Escherichia coli*. *J. Bact.* **87** : 1339-1345 (1964).
16. DAVIES, J.; GORINI, L. and DAVIS, B. D.: Misreading of RNA codewords induced by aminoglycoside antibiotics. *Molec. Pharmacol.* **1** : 93-106 (1965).
17. DAVIES, J. and ROWND, R.: Transmissible multiple drug resistance in *Enterobacteriaceae*. *Science* **176** : 758-768 (1972).
18. DEMEREC, M.: Origin of bacterial resistance to antibiotics. *J. Bact.* **56** : 63-74 (1948).
19. FLAKS, J. G.; COX, E. C.; WITTING, M. L. and WHITE, J. R.: Polypeptide synthesis with ribosomes from streptomycin-resistant and dependent *E. coli*. *Biochem. biophys. Res. Commun.* **7** : 390-393 (1962).
20. HARWOOD, J. H. and SMITH, D. H.: Resistance factor-mediated streptomycin resistance. *J. Bact.* **97** : 1262-1271 (1969).
21. HERSHEY, A. D. and CHASE, M.: Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. *J. gen. Physiol.* **36** : 39-65 (1952).
22. KAJI, H. and TANAKA, Y.: Binding of dihydrostreptomycin to ribosomal subunits. *J. molec. Biol.* **32** : 221-230 (1968).
23. KITAMOTO, O.; KASAI, N.; FUKAYA, K. and KAWASHIMA, A.: Drug-sensitivity of the *Shigella* strains isolated in 1955. *J. Jap. Ass. Infect. Dis.* **30** : 403-404 (1965); quoted by WATANABE (1963).
24. LEBEK, G.: Die Uebertragung der Mehrfachresistenz gegen Antibiotika und Chemotherapeutika in ihrer Bedeutung für den Hospitalismus mit mehrfachresistenten gramnegativen Darmbakterien. *Zbl. Bakt., I. Abt. Orig.* **191** : 387-395 (1963).

25. LEDERBERG, J.: Streptomycin resistance : a genetically recessive mutation. *J. Bact.* 61 : 549-550 (1951).
26. LEDERBERG, J. and LEDERBERG, E.M.: Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. *J. Bact.* 63 : 399-406 (1952).
27. LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. and RANDALL, R.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. biol. Chem.* 193 : 265-275 (1951).
28. LURIA, S.E. and DELBRÜCK, M.: Mutation of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. *Genetics* 28 : 491-511 (1943).
29. LUZZATTO, L.; APIRION, D. and SCHLESSINGER, D.: Mechanism of action of streptomycin of the ribosome cycle at the initiation of protein synthesis. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* 60 : 873-880 (1968).
30. LUZZATTO, L.; SCHLESSINGER, D. and APIRION, D.: *Escherichia coli* : high resistance or dependence on streptomycin produced by the same allele. *Science* 161 : 478-479 (1968).
31. MITRA, S.; ENGER, M.D. and KAESBERG, P.: Physical and chemical properties of RNA from the bacterial virus R17. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* 50 : 68-75 (1963).
32. MITSUHASHI, S.; HARADA, K. and KAMEDA, M.: On the drug resistance of enteric bacteria. 6.- Spontaneous and artificial elimination of transmissible drug-resistance factors. *Jap. J. exp. Med.* 31 : 119-123 (1961a).
33. MITSUHASHI, S.; HARADA, K. and KAMEDA, M.: Elimination of transmissible drug-resistance by treatment with acriflavine. *Nature (Lond.)* 189 : 947 (1961b).
34. MOMOSE, H. and GORINI, L.: Genetic analysis of streptomycin dependence in *Escherichia coli*. *Genetics* 67 : 19-38 (1971).
35. NEU, H.C. and CHOU, J.: Release of surface enzymes in *Enterobacteriaceae* by osmotic shock. *J. Bact.* 94 : 1934-1945 (1967).
36. NIRENBERG, M.W. and MATTHAEI, J.H.: The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* 47 : 1588-1602 (1961).
37. NOMURA, M.: Bacterial ribosome. *Bact. Rev.* 34 : 228-277 (1970).
38. NOSSAL, N.G. and HEPPEL, L.A.: The release of enzymes by osmotic shock from *Escherichia coli* in exponential phase. *J. biol. Chem.* 241 : 3055-3062 (1966).
39. OKAMOTO, S. and SUZUKI, Y.: Chloramphenicol-, dihydrostreptomycin- and kanamycin-inactivating enzymes from multiple drug-resistant *Escherichia coli* carrying episome 'R'. *Nature (Lond.)* 208 : 1301-1303 (1965).
40. OUCHTERLONY, O.: Diffusion-in-gel method for immunological analysis. II. *Progr. Allergy* 6 : 30-154 (1962).
41. OZAKI, M.; MISUSHIMA, S. and NOMURA, M.: Identification and functional characterization of the protein controlled by the streptomycin-resistant locus in *E. coli*. *Nature (Lond.)* 222 : 333-339 (1969).
42. OZANNE, B.; BENVENISTE, R.; TIPPER, D. and DAVIES, J.: Aminoglycoside antibiotics : inactivation by phosphorylation in *Escherichia coli* carrying R factors. *J. Bact.* 100 : 1144-1146 (1969).
43. PERRY, D.: Accumulation of ¹⁴C-streptomycin by streptomycin-sensitive and streptomycin-resistant group H streptococci. *J. Bact.* 97 : 518-521 (1969).
44. PIGUET, J.D. et PITTON, J.S.: Standardisation de l'interprétation des dosages microbiologiques d'antibiotiques. Emploi d'une calculatrice électronique. I.- Présentation du problème. *Pharm. Acta Helv.* 43 : 713-725 (1968).
45. PITTON, J.S.: Mechanisms of bacterial resistance to antibiotics. *Rev. Physiol.* 65 : 15-93 (1972).
46. RASSEKH, M. et PITTON, J.S.: Les modes de résistance à la streptomycine chez les salmonelles sauvages. Conférence de la Société Française de Microbiologie, Section des Agents Antimicrobiens. Paris 7 décembre 1972.
47. ROSENKRANZ, H.S.: Basis of streptomycin resistance in *Escherichia coli* with a 'multiple drug-resistance' episome. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* 80 : 342-345 (1964).
48. SANDERSON, K.E.: Revised linkage map of *Salmonella typhimurium*. *Bact. Rev.* 31 : 354-372 (1967).
49. SANDERSON, K.E. and DEMEREC, M.: The linkage map of *Salmonella typhimurium*. *Genetics* 51 : 897-913 (1965).

50. SCHEIDEGGER, J.J.: Une microméthode de l'immunoélectrophorèse. *Int. Arch. Allergy* 7 : 103-110 (1955).
51. SPEYER, J.F.; LENGYEL, P. and BASILIO, C.: Ribosomal location of streptomycin sensitivity. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* 48 : 684-686 (1962).
52. STANLEY, F.; CITARELLA, R.V. and WOHLHIETER, J.A.: The molecular nature of R-factors. *J. molec. Biol.* 17 : 102-116 (1966).
53. TAYLOR, A.L. and TROTTER, C.D.: Revised linkage map of Escherichia coli. *Bact. Rev.* 31 : 332-353 (1967).
54. TISSIERES, A.; WATSON, J.D.; SCHLESSINGER, D. and HOLLINGWORTH, B.R.: Ribonucleoprotein particles from Escherichia coli. *J. molec. Biol.* 1 : 221-233 (1959).
55. TRAUB, P.: Structure, function and 'in vitro' reconstitution of Escherichia coli ribosomes. *Curr. Top. in Microbiol.* 52 : 1-93 (1970).
56. TRAUB, P.; HOSOKAWA, K. and NOMURA, M.: Streptomycin sensitivity and the structural components of the 30S ribosomes of Escherichia coli. *J. molec. Biol.* 19 : 211-214 (1966).
57. TRAUB, P. and NOMURA, M.: Structure and function of E. coli ribosomes. V. - Reconstitution of functionally active 30S ribosomal particles from RNA and proteins. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* 59 : 777-784 (1968a).
58. TRAUB, P. and NOMURA, M.: Streptomycin resistance mutation in Escherichia coli : altered ribosomal protein. *Science* 160 : 198-199 (1968b).
59. TRAUT, R.F.; DELIUS, H.; AHMAD-ZADEH, C.; BICKLE, T.A.; PEARSON, P. and TISSIERES, A.: Ribosomal proteins of E. coli : stoichiometry and implication for ribosome structure. *Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.* 34 : 25-38 (1969).
60. UMEZAWA, H.; OKANISHI, M.; KONDO, S.; HAMANA, K.; UTAHARA, R.; MAEDA, K. and MITSUHASHI, S.: Phosphorylative inactivation of aminoglycosidic antibiotics by Escherichia coli carrying R factor. *Science* 157 : 1559-1561 (1967).
61. UMEZAWA, H.; TAKASAWA, S. and OKANISHI, M.: Adenylstreptomycin, a product of streptomycin inactivated by E. coli carrying R-factor. *J. Antibiot.* 21 : 81-82 (1968).
62. VESTERBERG, O. and SVENSSON, H.: Isoelectro fractionation analysis and characterization of ampholytes in natural pH gradients. IV. Further studies on the resolving power in connection with separation of myoglobins. *Acta chem. scand.* 20 : 820-834 (1966).
63. WATANABE, T.: Infective heredity of bacterial drug resistance. *Bact. Rev.* 27 : 87-115 (1963).
64. WATANABE, T. and FUKASAWA, T.: Episome-mediated transfer of drug resistance in Enterobacteriaceae. II. Elimination of resistance factors with acridine dyes. *J. Bact.* 81 : 679-683 (1961).
65. WEBER, K. and OSBORN, M.: The reliability of molecular weight determinations by dodecylsulphate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. biol. Chem.* 244 : 4406-4412 (1969).
66. YAMADA, T. and DAVIES, J.: A genetic and biochemical study of streptomycin and spectinomycin-resistance in Salmonella typhimurium. *Molec. gen. Genetics* 110 : 197-210 (1971).
67. YAMADA, T.; TIPPER, D. and DAVIES, J.: Enzymatic inactivation of streptomycin by R-factor-resistant Escherichia coli. *Nature (Lond.)* 219 : 288-291 (1968).

